Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16 **БИОЛОГИЯ**

Том 79 • № 1 • 2024 • ЯНВАРЬ — МАРТ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные исследования

Шуваева В.Н., Горшкова О.П. Роль каналов BK_{Ca} в дилатации пиальных артерий у крыс разного возраста 3

Лукашев Е.П., Нокс П.П., Страховская М.Г., Пащенко В.З. Краситель 10-N-нонилакридиновый оранжевый как флуоресцентный индикатор действия антисептика октенидина на мембраны хроматофоров *Rhodobacter sphaeroides* 12

Полошевец Т.В., Онипченко В.Г., Сандалова Е.В., Джатдоева Т.М., Елумеева Т.Г. Функциональные признаки листьев и стратегии растений субальпийских вейниковых лугов северо-западного Кавказа 21

Гордеев И.И., Токарев Ю.С., Давыдов Е.А., Екимова И.А., Дроздов К.А., Яценко И.О., Яценко О.В., Кочунова Н.А., Бухарова Н.В., Кондратьев М.С., Миролюбов А.А., Рожкова-Тимина И.О., Макеев С.С., Гришина Д.Ю., Плаксин А.Д., Семенов А.А. Комплексная научно-исследовательская экспедиция «Крильон 2023»: первые находки и предварительные результаты 28

Сурков М.М., Мамчур А.А., Станишнева-Коновалова Т.Б., Рубин А.Б., Ярошевич И.А. Теоретическое описание паккерных состояний циклических групп каротиноидов 50

Адамова В.В., Украинский П.А. Моделирование пространственного распространения европейского наземного моллюска *Cochlodina laminata* (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae) в восточной части ареала 57

Воробьева Н.В., Мунтян М.С. Особенности образования нейтрофильных внеклеточных ловушек у кроликов породы шиншилла 66

Ильина Т.Н., Баишникова И.В., Якимова А.Е., Зайцева И.А. Содержание витаминов А и Е в тканях рыжей полевки (*Myodes* (*Clethrionomys*) *glareolus*) и обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus*), обитающих в Карелии 72

© Издательство Московского университета, “Вестник Московского университета”, 2024

Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 79 • No. 1 • 2024 • JANUARY — MARCH

Quarterly

Moscow University Press

CONTENTS

Research articles

Shuvaeva V.N., Gorshkova O.P. Role of BK_{Ca} channels in pial vessel dilation in rats of different ages 3

Lukashev E.P., Knox P.P., Strakhovskaya M.G., Paschenko V.Z. Dye 10-N-nonyl acridine orange as a fluorescent indicator of the action of the antiseptic octenidine on the membranes of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores 12

Poloshevets T.V., Onipchenko V.G., Sandalova E.V., Dzhatdoeva T.M., Elumeeva T.G. Leaf functional traits and strategies of plants in subalpine Calamagrostis meadows of the North-Western Caucasus 21

Gordeev I.I., Tokarev Yu.S., Davydov E.A., Ekimova I.A., Drozdov K.A., Yatsenko I.O., Yatsenko O.V., Kochunova N.A., Bukharova N.V., Kondratyev M.S., Miroliubov A.A., Rozhkova-Timina I.O., Makeev S.S., Grishina D.Yu., Plaksin A.D., Semenov A.A. Complex research expedition "Crillon 2023": first findings and preliminary results 28

Surkov M.M., Mamchur A.A., Stanishneva-Konovalova T.B., Rubin A.B., Yaroshevich I.A. Theoretical description of pucker states of cyclic groups of carotenoids 50

Adamova V.V., Ukrainskiy P.A. Modeling the spatial distribution of the European land snail *Cochlodina laminata* (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae) in the eastern part of the range 57

Vorobjeva N.V., Muntyan M.S. Peculiarities of neutrophil extracellular traps formation in chinchilla rabbits 66

Ilyina T.N., Baishnikova I.V., Yakimova A.E., Zaitseva I.A. Vitamins A and E content in the tissues of the bank vole (*Myodes* (*Clethrionomys*) *glareolus*) and common shrew (*Sorex araneus*) inhabiting in Karelia 72

© Moscow University Press,
"Lomonosov Biology Journal," 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.017.647+616.053+612.133

Роль каналов BK_{Ca} в дилатации пиальных артерий у крыс разного возраста

В.Н. Шуваева*, О.П. Горшкова

Институт физиологии имени И.П. Павлова, Российская академия наук, Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

**e-mail: shuvaevavn@infran.ru*

Исследование механизмов возрастных изменений сосудистых реакций и применение полученных знаний в клинике может способствовать снижению количества осложнений и смертности от заболеваний сердечно-сосудистой системы, частота которых увеличивается с возрастом. При старении усиливается дисфункция эндотелия и наблюдаются нарушения мозгового кровообращения, вызванные возникновением очагов ишемии. Одним из основных элементов регуляции сосудистого тонуса, наряду со множеством важных механизмов, являются ионные калиевые каналы. В настоящей работе изучали возрастные изменения роли кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости (BK_{Ca}) в ацетилхолин-опосредованной дилатации мозговых артерий у крыс Wistar, поскольку вклад этих каналов в вазодилатацию при старении изучен недостаточно. Методом прижизненной микрофотосъемки (×470) сравнивали реакции пиальных артерий на ацетилхолин (АХ, ацетилхолина хлорид, 10^{-7} М, 5 мин) в отсутствие и на фоне блокады BK_{Ca} с помощью хлорида тетраэтиламмония (ТЭА, 2 мМ, 5 мин) у крыс Wistar в возрасте 4, 6, 9, 18 и 24 мес. Изменения вклада BK_{Ca} в дилатацию сосудов оценивали по изменению числа дилатаций пиальных артерий в ответ на воздействие АХ после блокады BK_{Ca}, измеряя ширину сосудов в трех отдельных группах артерий: мелких (диаметром менее 20 мкм), средних (20–40 мкм) и крупных (более 40 мкм). Показано, что АХ-индуцированная дилатация зависит от начального диаметра артерий. Ингибирование активности BK_{Ca} у 4-месячных крыс уменьшало число АХ-индуцированных дилатаций во всех группах исследованных артерий. По сравнению с 4-месячными крысами у 6- и 18-месячных животных был снижен вклад BK_{Ca} в дилатацию мелких, у 9- и 24-месячных – увеличен вклад BK_{Ca} в дилатацию средних артерий; вклад BK_{Ca} в дилатацию крупных артерий снижался, начиная с 6-месячного возраста. Заключается, что BK_{Ca} играют значительную роль в АХ-опосредованной дилатации пиальных артерий. Возрастные нарушения вклада этих каналов в АХ-опосредованную дилатацию пиальных артерий развиваются постепенно, имеют волнообразное течение и зависят от диаметра артерий. Выявленные нарушения функциональной активности BK_{Ca} могут служить терапевтическими мишенями для создания новых технологий лечения возрастных поражений церебральных сосудов.

Ключевые слова: *старение, пиальные артерии, вазодилатация, ацетилхолин, кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости, гладкомышечные клетки сосудов*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-1-1

Введение

Знание механизмов возрастных изменений сосудистых реакций и применение полученных знаний в клинике может способствовать снижению выраженности осложнений и смертности от заболеваний сердечно-сосудистой системы, частота которых особенно высока у пожилых людей [1]. При старении усиливается дисфункция эндотелия и наблюдаются нарушения мозгового кровообращения, вызванные локальным сужением мелких церебральных сосудов и возникновением очагов ишемии, поэтому исследование механизмов возрастной вазодилататорной регуляции сосудистого тонуса имеет важное значение. Изменение вазодилатации с возрастом связывают с нарушением синтеза и снижением биодоступности оксида азота (NO) в эндотелии [2]. Важнейшими элементами регуляции сосудистого тонуса являются также ионные каналы, экспрессируемые как в эндотелиальных, так и в сосудистых гладкомышечных клетках (ГМК). Эти каналы играют ключевую роль в интеграции и передаче генерируемых в эндоте-

© Шуваева В.Н., Горшкова О.П., 2024

лии химических сигналов к нижележащим ГМК сосудов [3]. Кальций-активируемые калиевые каналы (K_{Ca}) широко представлены в различных тканях и активируются увеличением внутриклеточной концентрации Ca^{2+}. Эти каналы названы в соответствии с их проводимостью и механизмом открывания-закрывания: активируемые кальцием калиевые каналы с большой проводимостью ионов Ca^{2+} обозначаются как BK_{Ca} или K_{Ca} 1.1. BK_{Ca} состоят из порообразующей α-субъединицы и β-субъединицы и отличаются от других калиевых каналов наличием дополнительных участков на NH_2-конце и С-конце молекулы α-субъединицы. Это позволяет α-субъединице соединяться с различными молекулами, что ведет к разнообразию BK_{Ca}, экспрессируемых в различных органах, и обеспечивает динамическую регуляцию их функций [4]. Эндотелий-зависимая вазодилатация опосредуется широким спектром факторов, включая NO, простациклин, эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor) и ряд других. Одним из основных вазодилататоров, влияющих на активность BK_{Ca}, является NO. Исследования механизмов релаксирующего действия NO на кровеносные сосуды выявили роль BK_{Ca} в гладких мышцах в качестве одного из нижестоящих эффекторов NO [5]. В сосудах головного мозга NO может активировать BK_{Ca}, а также стимулировать саркоплазматический ретикулум, вызывая дискретные токи Ca^{2+}, активирующие соседние кластеры BK_{Ca} [6]. Синтезируемый под действием NO циклогуанидинмонофосфат активирует протеинкиназу G, а последняя способствует активации BK_{Ca}, что приводит к изменению мембранного потенциала ГМК в сторону их гиперполяризации и расслабления [7]. Имеются данные, что BK_{Ca} могут служить мишенью и для EDHF [8]. Изменение активности BK_{Ca}, в свою очередь, может стимулировать или ограничивать NO-зависимую дилатацию сосудов [9]. Однако роль BK_{Ca} сосудистых ГМК в поддержании миогенного тонуса и в вазоактивных реакциях сосудистого русла не вполне ясна.

Так как вклад BK_{Ca} в вазодилатацию в связи со старением изучен недостаточно подробно, целью данной работы было исследование возрастных изменений вклада BK_{Ca} в ацетилхолин-опосредованную (АХ-опосредованную) дилатацию мозговых артерий у крыс.

Материалы и методы исследования

Использованы самцы крыс Wistar из Центра коллективного пользования «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем» (Санкт-Петербург, Институт физиологии имени И.П. Павлова РАН), содержавшиеся в стандартных условиях при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стандартной диете в условиях искусственного освещения (12 ч свет/12 ч темнота).

Эксперименты проведены на крысах в возрасте 4 мес. (n = 5, масса 230 ± 25 г), 6 мес. (n = 5, 305 ± 15 г), 9 мес. (n = 6, 455 ± 25 г), 18 мес. (n = 5, 485 ± 20 г) и 24 мес. (n = 7, 515 ± 35 г). В эксперименте среднее артериальное давление (АД) (таблица) у наркотизированных хлоралгидратом (43 мг/100 г массы тела, внутрибрюшинно) крыс измеряли инвазивным методом через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к компьютеру.

Методом прижизненной микрофотосъемки [10] (×470) у каждого животного после трепанации в теменной области черепа фиксировали фоновое изображение пиальной сосудистой сети в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором Кребса (37 °С) и реакцию артериальных сосудов на воздействие препаратов. Оценивали изменения в дилатации пиальных артерий по числу расширившихся участков сосудистой сети, дополнительно оценивали степень расширения артериальных сосудов. В качестве агониста эндотелий-зависимой вазодилатации использовали АХ [11] в концентрации 10^{-7} М, при орошении которым мягкой мозговой оболочки у молодых крыс наблюдали преимущественную дилатацию пиальных артерий [12]. Индуцированную АХ (10^{-7} М, 5 мин; Sigma, США) дилатацию считали базовой реакцией (100%) и с ней сравнивали результаты, полученные при действии АХ на фоне блокатора BK_{Ca} – хлорида тетраэтиламмония (ТЭА, «Вектон», Россия, 2 мМ, предварительное орошение поверхности мозга в течение 5 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора). У всех крыс регистрировали изображение пиальных артерий до и на фоне действия АХ, ТЭА и совместного действия ТЭА и АХ. Оценивали число сузившихся и дилатированных пиальных артерий и степень их реакции на воздействие АХ в каждой возрастной группе: у 4-, 6-, 9-, 18- и 24-месячных крыс. Проверка по критерию Краскела-Уоллеса показала отсутствие значимых различий между отдельными животными одного возраста в фоновых реакциях на воздействие АХ. Эксперимент длился 60–90 мин, после чего животных выводили из эксперимента передозировкой раствора хлоралгидрата.

Таблица

Показатели АД у крыс разного возраста

Возраст крыс	Показатели среднего АД, мм рт. ст.
4 мес. (n = 5)	100 ± 5
6 мес. (n = 5)	97 ± 4
9 мес. (n = 6)	95 ± 6
18 мес. (n = 5)	96 ± 4
24 мес. (n = 7)	92 ± 3

Диаметр сосудов измеряли на статических изображениях с помощью оригинальной компьютерной программы «Blood Vessel Media Analyzer» (© Denis Chouvaev, Швеция). В программе предусмотрен режим контраста и увеличения изображения, а также калибровки для пересчета всех координат в метрические единицы. У каждой крысы было измерено от 30 до 50 артериальных участков. Для анализа артерии были разделены на три группы в соответствии с их диаметрами: 1) <20 мкм (мелкие), 2) 20–40 мкм (средние) и 3) >40 мкм (крупные). В каждой возрастной группе примерно 30% артерий приходилось на мелкие, около 50% – на средние и 20% – на крупные сосуды; число проанализированных артерий в каждой из возрастных групп находилось в пределах 150–200. По изменению числа артерий, сузившихся в ответ на воздействие блокатора, судили об изменении вклада BK_{Ca} в базальный тонус сосудов с возрастом. Об изменении вклада BK_{Ca} в дилатацию артерий судили по изменению числа дилатированных сосудов и степени их дилатации в ответ на воздействие АХ на фоне ТЭА. Изменение числа расширившихся артерий выражали в процентах от общего числа исследованных артерий в группе с соответствующими диаметрами. Степень дилатации оценивали в процентах как разность между значениями диаметра после и до воздействия АХ, отнесенную к диаметру сосуда перед воздействием АХ. Изменения диаметра в покое в отсутствие каких-либо воздействий не превышали 5,0 ± 0,5%, поэтому при таких значениях считали, что реакция на воздействие отсутствует.

Данные по отдельной группе артерий усреднялись для каждого животного и использовались для статистических сравнений. Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США). Проверка экспериментальных данных на нормальность распределения проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова в программе InStat 3.02. В случае если хотя бы в одной из сравниваемых выборок отсутствовало нормальное распределение, для статистического анализа данных использовались непараметрические тесты: сравнение средних данных двух независимых выборок проводилось с использованием U-критерия Манна-Уитни, для сравнения нескольких выборок использовался критерий Краскела-Уоллиса (KW). Данные на графиках (боксплоты) представлены как медиана, минимум, максимум, процентили [25-й процентиль; 75-й процентиль]. Значимым уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Орошение поверхности головного мозга раствором АХ у крыс в возрасте 4 мес. вызывало дилатацию у 42% всех исследованных пиальных артерий, констрикцию – у 36%, а 22% артерий не изменяли диаметр. В других возрастных группах наблюдалась сходная картина: дилатация и констрикция наблюдались в 30–40% случаев, а примерно 20% сосудов не изменяли диаметр. Такая гетерогенная реакция, как показывают наши многолетние исследования, характерна для пиальной сосудистой сети. Для анализа сосудистых реакций все исследованные артерии были распределены по группам в соответствии с их диаметрами. В литературе имеются сведения о том, что вклад калиевых каналов в сосудистые реакции неоднороден и варьируется в зависимости от размера сосудов [13], об этом свидетельствуют и наши предыдущие исследования [10, 14].

У 4-месячных крыс число расширившихся в ответ на воздействие АХ мелких и средних артерий составило 41,9 [33,3; 50,0] и 55,0% [30,0; 65,0] соответственно, крупных – 34,6% [31,6; 37,1] (рис. 1А). Степень АХ-опосредованных дилатаций от мелких к крупным пиальным артериям снижалась (рис. 1Б).

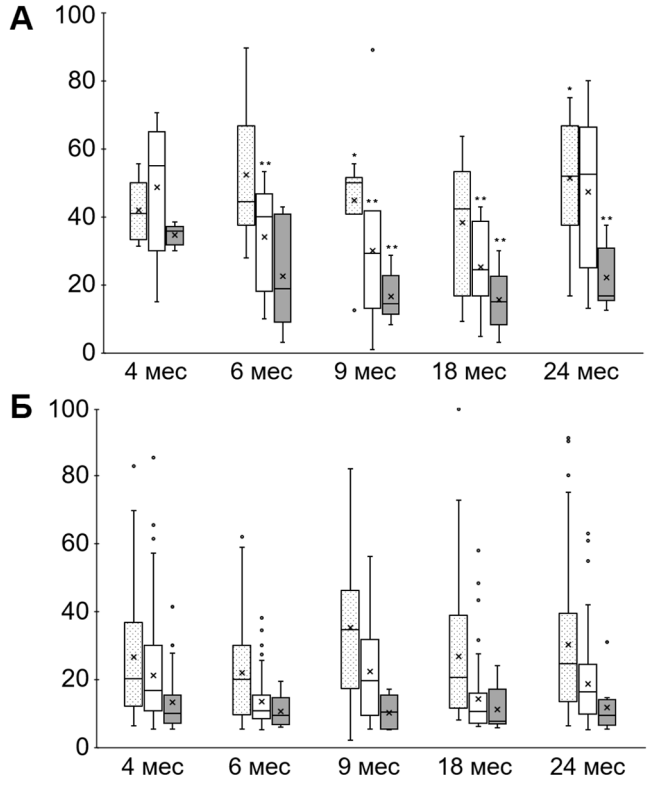


Рис. 1. АХ-индуцированная дилатация пиальных артерий у крыс разного возраста в группах сосудов с различными диаметрами. **А** – число дилатаций, **Б** – степень дилатаций. *По оси ординат* – число дилатаций, % от числа сосудов соответствующего диаметра (**А**), изменение диаметра сосудов относительно их диаметра перед воздействием АХ (**Б**). *По оси абсцисс* – возраст крыс, мес. Точечная штриховка – артерии диаметром <20 мкм, белая заливка – артерии диаметром 20–40 мкм, серая заливка – артерии диаметром >40 мкм. Различия между группами сосудов с одинаковым диаметром относительно соответствующих значений у 4-месячных крыс (попарные сравнения) статистически значимы: * – $p < 0,05$.

Обозначения на рисунке: Верхняя и нижняя граница каждого прямоугольника – первый и третий квартили (25-й и 75-й процентили) соответственно, поперечная линия внутри – медиана (50-й процентиль), крестик внутри – среднее арифметическое, концы отрезков – 10-й и 90-й процентили, точки – выбросы.

Для изучения роли BK_{Ca} в индуцированной АХ дилатации пиальных артерий использовали блокатор BK_{Ca} – ТЭА – в миллимолярной концентрации. В каждой возрастной группе сравнивали изменение реакции артерий определенного калибра на АХ (по числу дилатированных артерий и степени их дилатации) на фоне блокады BK_{Ca} с числом и степенью дилатаций в ответ на воздействие АХ перед применением блокатора. Значения указанных параметров перед применением блокатора принимали за 100% (базовый тест на АХ).

На фоне блокады BK_{Ca} у крыс в возрасте 4 мес. уменьшилось число АХ-индуцированных дилатаций артерий всех диаметров (рис. 2) по сравнению с их числом до блокады BK_{Ca}. Максимальное уменьшение числа дилатаций до 55,6% [42,2; 68,9], наблюдалось в мелких сосудах. Число дилатированных средних и крупных артерий на фоне блокады BK_{Ca} снизилось в меньшей степени: до 81,3% [80,7; 81,8]) и до 78,4% [74,6; 82,1] соответственно. Степень дилатации на фоне блокады в сравнении с ответом на воздействие АХ в отсутствие блокады BK_{Ca} (рис. 3) сильнее всего снизилась у крупных сосудов до 59,8% [55,5; 62,7]). У мелких и средних артерий она снижалась до 71,5 [67,7; 75,5] и до 74,7% [73,0; 76,4] соответственно.

У крыс в возрасте 6 мес. общее число дилатированных в ответ на воздействие АХ артерий составило 43%. Сопоставление реакций артерий разных диаметров на воздействие АХ показало, что наибольшее число АХ-опосредованных дилатаций наблюдалось в группе мелких (44,4% [37,5; 66,6]) и средних артерий (40,0% [18,0; 46,7]), число расширившихся крупных артерий составило 18,8% [8,3; 40,7] (рис. 1А). Степень дилатации артерий всех диаметров у 6-месячных крыс, а также у крыс в возрасте 9–24 мес. достоверно не отличалась от аналогичных показателей у крыс в возрасте 4 мес. (рис. 1Б), снижаясь от мелких к крупным сосудам у крыс одного возраста.

На фоне блокады BK_{Ca} число АХ-индуцированных дилатаций мелких артерий у 6-месячных крыс снизилось до 71,4% [63,4; 81,0], а их степень не менялась, тогда как степень дилатации средних и крупных сосудов незначительно снизилась, соответственно, до 90,2 [88,0; 91,6] и 90,0% [84,6; 93,1] при неизменном числе дилатаций средних и небольшом увеличении числа дилатаций крупных артерий до 112,5% [97,6; 113,7] (рис. 2, 3).

У 9-месячных крыс число дилатированных в ответ на воздействие АХ артерий составило 35%. Сопоставление реакций на воздействие АХ артерий различных диаметров показало, что наибольшее число дилатаций приходится на мелкие артерии – 50% [40,6; 51,4]. Число дилатированных средних и крупных артерий составило 29,2 [12,5; 41,7] и 14,3% [11,3; 22,6] соответственно (рис. 1А).

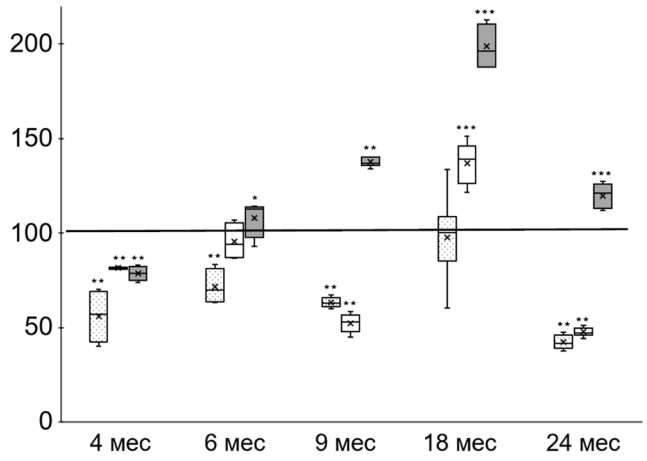


Рис. 2. Число АХ-индуцированных дилатаций пиальных артерий разного диаметра в каждой возрастной группе после блокады BK_{Ca}-каналов относительно числа АХ-индуцированных дилатаций артерий того же калибра в отсутствие блокады. По оси ординат – число дилатаций в ответ на АХ на фоне блокады BK_{Ca} относительно числа дилатаций в ответ на АХ перед блокадой, %. По оси абсцисс – возраст крыс, мес. Прямая линия 100% – число АХ-индуцированных дилатаций в отсутствие блокады. Точечная штриховка – артерии диаметром < 20 мкм, белая заливка – артерии диаметром 20–40 мкм, серая заливка – артерии диаметром > 40 мкм. Различия статистически значимы относительно значений перед блокадой: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

Обозначения на рисунке: Верхняя и нижняя граница каждого прямоугольника – первый и третий квартили (25-й и 75-й процентили) соответственно, поперечная линия внутри – медиана (50-й процентиль), крестик внутри – среднее арифметическое, концы отрезков – 10-й и 90-й процентили, точки – выбросы.

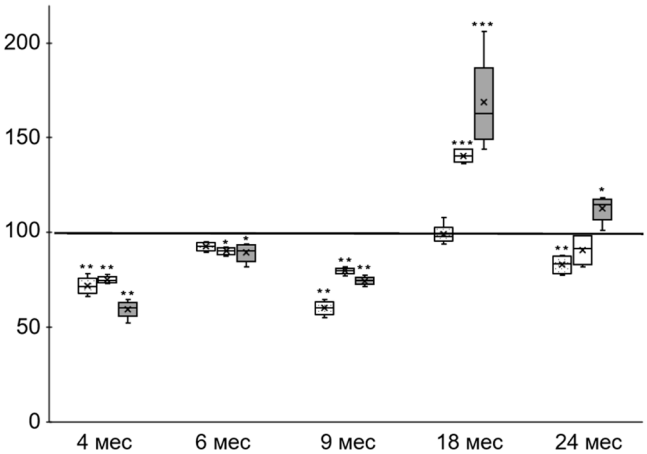


Рис. 3. Степень дилатации пиальных артерий в ответ на АХ в каждой возрастной группе в группах сосудов с различными диаметрами на фоне блокады BK_{Ca}-каналов относительно степени дилатации артерий того же калибра в ответ на АХ в отсутствие блокады. По оси ординат – изменение диаметра сосудов в ответ на АХ при блокаде BK_{Ca} относительно изменения их диаметра в ответ на АХ перед блокадой BK_{Ca}, %. По оси абсцисс – возраст крыс, мес. Прямая линия 100% – степень АХ-индуцированных дилатаций в отсутствие блокады. Точечная штриховка – артерии диаметром < 20 мкм, белая заливка – артерии диаметром 20–40 мкм, серая заливка – артерии диаметром > 40 мкм. Различия статистически значимы относительно значений перед блокадой: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

Обозначения на рисунке те же, что на рис. 2.

У 9-месячных крыс на фоне блокады BK_{Ca} АХ-индуцированная дилатация мелких и средних артерий снизилась: число дилатированных мелких артерий уменьшилось до 62,9 [61,0; 65,5], средних артерий – до 53,0 [47,8; 56,6], в то время как число дилатированных крупных артерий увеличилось до 137,3% [135,6; 140,0] по сравнению с соответствующим числом дилатаций в ответ на воздействие АХ в отсутствие блокады (рис. 2). Степень дилатации при этом во всех группах артерий снижалась (рис. 3): до 59,9 [56,5; 63,3] у мелких артерий, до 79,8 [78,2; 81,0] – у средних и до 74,4% [72,3; 75,9] – у крупных.

У достигших 18-месячного возраста крыс общее число артерий, расширившихся в ответ на воздействие АХ, составило 26%. Наибольшее число АХ-индуцированных дилатаций отмечено в группе мелких артерий 42,2% [16,6; 53,2]. Число дилатированных средних и крупных артерий составило 25,2 [16,6; 38,6] и 15,5% [8,3; 22,5] соответственно (рис. 1А).

На фоне блокады BK_{Ca} у 18-месячных крыс АХ-индуцированная дилатация мелких артерий не изменялась: число дилатированных артерий и степень дилатации остались такими же, как до блокады BK_{Ca} (рис. 2, 3). Число дилатированных средних артерий увеличилось до 138,9 [126,2; 145,8] и крупных – до 196,1% [187,7; 210,3] по сравнению с таковым до воздействия блокатора, степень дилатации также увеличилась – до 140,3 [137,1; 143,6] у средних и до 162,5% [149,5; 186,5] у крупных артерий по сравнению со значениями данных показателей до блокады.

В возрасте 24 мес. у крыс в ответ на воздействие АХ расширилось 43% всех исследованных артерий. Сопоставление реакций на воздействие АХ по группам артерий различных диаметров показало, что у животных этого возраста расширялись преимущественно мелкие (51,2% [37,5; 66,6]) и средние артерии (52,5% [25,0; 66,3]) число расширившихся крупных артерий составило 16,7% [15,4: 30,8] (рис. 1А).

На фоне блокады BK_{Ca} число АХ-индуцированных дилатаций мелких и средних артерий уменьшилось, соответственно, до 42,2 [38,8; 45,8]) и до 47,5% [46,1; 49,6], а крупных – увеличилось до 120,8% [113,0; 125,6] по сравнению с базовым тестом на АХ (рис. 2). Степень дилатации достоверно не изменялась относительно соответствующих значений до блокады BK_{Ca}-каналов в группе средних артерий, в группе мелких снизилась до 82,9 [78,1; 87,4] и увеличилась до 114,4% [106,7; 117,2] у крупных артерий (рис. 3). Такая неоднозначная реакция сосудов разного диаметра может быть обусловлена как их разным миогенным тонусом, так, вероятно, и различной плотностью BK_{Ca}. Поскольку BK_{Ca} являются нижестоящим эффектором и для NO [5], и для EDHF [8], а NO и EDHF по-разному представлены в сосудах разного калибра [13], это может влиять на реакцию сосудов. Изменение активности BK_{Ca}, в свою очередь, может стимулировать либо ограничивать NO-зависимую дилатацию [9]. Для дилатации важно также продольное распространение гиперполяризующего тока [15].

Характерной особенностью реакции пиальной сосудистой сети на воздействия является не только изменение степени реакции сосуда, но и вовлечение новых участков в сосудистый ответ. В наших экспериментах в ряде случаев не наблюдалось значительных различий в степени дилатации сосудов, тогда как число расширившихся участков увеличивалось, поэтому основное внимание было уделено оценке числа расширившихся сосудов. По изменению числа расширившихся в ответ на воздействие АХ артерий на фоне блокады BK_{Ca} судили о вкладе последних в дилатацию сосудов разных калибров у крыс разного возраста. Исследование возрастных изменений в АХ-индуцированной дилатации пиальных артерий на фоне блокады BK_{Ca} показало, что по сравнению с 4-месячными крысами у 6- и 18-месячных снижен вклад BK_{Ca} в дилатацию мелких, у 9- и 24-месячных увеличен вклад BK_{Ca}-каналов в дилатацию средних артерий, а вклад BK_{Ca} в дилатацию крупных артерий снижается, начиная с 6-месячного возраста.

Артерии мягкой мозговой оболочки обеспечивают распределение мозгового кровотока и компенсацию последствий снижения системного АД в дополнение к функциям магистральных артерий, отвечающих за стабилизацию величины мозгового кровотока при изменении АД. Мелкие пиальные артерии ответственны за регуляцию притока крови во внутримозговые сосуды, тогда как для пиальных артерий среднего калибра характерна функция перераспределения кровотока в зависимости от потребностей того или иного участка мозга [12, 16]. Базальные нейроны переднего мозга увеличивают кровоток в коре, высвобождая АХ, который стимулирует эндотелиальные клетки (ЭК) к выработке вазодилататоров [17]. Учитывая воздействие АХ непосредственно на ЭК, мы использовали его в качестве вазодилататорного агента [11].

АХ вызывал дилатацию пиальных артериальных сосудов в 30–50% случаев, при этом степень дилатации снижалась от мелких к более крупным сосудам во всех возрастных группах (рис. 1Б). По сравнению с молодыми 4-месячными крысами число АХ-индуцированных дилатаций изменялось с возрастом, при этом реакции артерий малого, среднего и большого диаметров изменялись по-разному.

Так, у 6-месячных крыс при примерно одинаковой с 4-месячными крысами степени дилатации число дилатированных средних артерий было меньше (рис. 1А, Б). В возрасте 9 мес. эта тенден-

ция усиливалась: число дилатированных не только средних, но и крупных артерий снижалось по сравнению с таковым у 4-месячных крыс. Следовательно, изменения в реакциях пиальной сосудистой сети начинают проявляться уже в 6 мес. и сохраняются в более старшем возрасте. Дальнейшее старение, вплоть до 24 мес., практически не влияло на степень АХ-опосредованной дилатации пиальных артерий. В 18-месячном возрасте были отмечены более значительные изменения: значимо уменьшалось общее число АХ-индуцированных дилатаций (26% по сравнению с 42% у 4-месячных и с 35% – у 9-месячных), преимущественно за счет снижения числа дилатаций средних и крупных артерий. Число дилатаций мелких артерий соответствовало значениям у 4-месячных крыс. Указанные изменения свидетельствуют о нарушении эндотелий-зависимой регуляции тонуса средних и крупных пиальных артерий на этом этапе старения. У крыс в возрасте 24 мес. число расширившихся мелких артерий было значимо больше, а крупных – меньше, чем у 4-месячных крыс. Следовательно, снижение роли АХ-опосредованных механизмов в дилатации пиальных артерий диаметром более 20 мкм и повышение роли этих механизмов в дилататорной реакции мелких пиальных артерий у крыс может обусловливать возрастные изменения мозгового кровотока, связанные с функционированием пиальной сосудистой сети [18, 19].

Эндотелий кровеносных сосудов играет решающую роль в регуляции кровотока, контролируя механические функции гладких мышц артерий [20]. Регуляция эндотелием релаксации и сокращения гладких мышц сосудов в основном достигается за счет высвобождения вазоактивных веществ, преимущественно NO, который оказывает расслабляющее действие на кровеносные сосуды через активацию растворимой гуанилатциклазы. Исследования механизмов релаксирующего действия NO на кровеносные сосуды выявили роль BK_{Ca} в гладких мышцах в качестве одного из нижестоящих эффекторов NO [5]. Как упоминалось выше, NO через посредничество протеинкиназы G участвует в активации BK_{Ca}, что в итоге вызывает гиперполяризацию и расслабление ГМК [7]. Существует сложное взаимодействие между многочисленными эндотелиальными сосудорасширяющими механизмами, которое позволяет поддерживать эндотелий-зависимую вазодилатацию. Например, при снижении биодоступности NO и/или простагландинов происходит усиление механизмов вазодилатации, зависящих от EDHF, особенно в микроциркуляции [8]. Указывается также, что при уменьшении синтеза NO, остаточная дилатация происходит благодаря увеличенной выработке простациклина, который играет компенсаторную роль в механизме вазодилатации в условиях дефицита NO [21]. Простациклин, связываясь со специфическими рецепторами ГМК, активирует аденилатциклазу, которая индуцирует синтез цАМФ, а цАМФ активирует протеинкиназу А, что в конечном счете ведет к расслаблению гладкой мускулатуры. При этом происходит открытие одного или нескольких типов калиевых каналов. Таким образом, образование простациклина ЭК синергично дополняет дилататорные реакции, обусловленные системой NO [22].

Сама структура BK_{Ca} определяет значительное функциональное разнообразие их подтипов, экспрессируемых в различных тканях. Различия в степени связывания α- и β-субъединиц канала обуславливают гетерогенность Ca^{2+}-чувствительности BK_{Ca} между сосудистыми ГМК и внутри них в различных органах и тканях. BK_{Ca} активны в условиях покоя, вносят вклад в мембранный потенциал и участвуют в регуляции миогенного тонуса по принципу отрицательной обратной связи, что было показано *in vivo* в экспериментах с использованием ТЭА в качестве блокатора BK_{Ca} для артериол трапециевидной мышцы (*musculus trapezius*) крыс и человека [4]. С другой стороны, ряд работ в конце 90-х гг. продемонстрировал, что ТЭА в концентрации 1 ммоль/л не влияет на диаметр пиальных артериол крыс *in vivo*, несмотря на значительный миогенный тонус в покое [23, 24]. Отмечается, что действие ТЭА на тонус сосудов имеет существенные видовые и регионарные различия [4]. Поэтому роль BK_{Ca} сосудистых ГМК в поддержании миогенного тонуса и в вазоактивных реакциях в системном сосудистом русле не вполне ясна. Однако наше предыдущее исследование [14] четко продемонстрировало, что аппликация ТЭА вызывает констрикцию 65% мелких пиальных артерий и в среднем около 40% средних и крупных артерий у крыс в возрасте 4 мес., что свидетельствует об участии BK_{Ca} в регуляции сокращения-расслабления ГМК в этих сосудах. В настоящем исследовании аппликация ТЭА вызывала констрикцию 63% всех проанализированных пиальных артерий у 4-месячных крыс, 40% – у 6-месячных, 60% – у 9-месячных, 40% – у 18-месячных и 50% – у 24-месячных.

В данном исследовании установлено, что число и амплитуда АХ-опосредованных дилатаций артерий, предварительно подвергнутых воздействию ТЭА, у 4-месячных крыс в группах артерий всех исследованных нами диаметров снижается по сравнению с базовым АХ-тестом в отсутствие блокады (рис. 2, 3). Эти результаты указывают на участие BK_{Ca} в АХ-индуцированной дилатации пиальных артерий наряду с другими факторами. У 6-месячных крыс число дилатаций артерий в ответ на воздействие АХ на фоне действия ТЭА снижалось только в группе мелких артерий (на 30%), но в значимо меньшей степени, чем у 4-месячных крыс (на 44%), сни-

жение степени дилатации также было менее выраженным по сравнению с таковым у 4-месячных крыс. Число дилатаций крупных артерий по сравнению с их числом в реакции на воздействие АХ в отсутствие блокады BK_{Ca} и с аналогичным показателем у 4-месячных животных увеличивалось. У крыс в возрасте 9 мес. число АХ-индуцированных дилатаций мелких артерий на фоне введения ТЭА соответствовало значениям у 4-месячных животных, а средних – уменьшалось в более значительной степени, чем у молодых крыс. Это может указывать на то, что BK_{Ca} не играют существенной роли в АХ-индуцированной дилатации средних артерий у 6-месячных крыс, тогда как в возрасте 9 мес. они вносят значительный вклад в дилатацию как мелких, так и средних пиальных артерий. Однако у 9-месячных крыс, также как и у животных в возрасте 6 мес., на фоне ТЭА увеличивалось число АХ-индуцированных дилатаций крупных артерий по сравнению с их числом до блокады. В возрасте 18 мес. увеличение числа и степени дилатаций в ответ на воздействие АХ наблюдалось уже не только в крупных, но и в средних артериях. У 24-месячных крыс на фоне блокады BK_{Ca} число дилатаций крупных артерий также увеличивалось. Как уже указывалось [14], активация BK_{Ca} внутриклеточными – локальными – токами («искрами») Ca^{2+} гиперполяризует мембрану ГМК, снижая активность потенциал-зависимых кальциевых каналов и ограничивая приток Ca^{2+} в клетку, тем самым способствуя релаксации ГМК и расширению сосудов. BK_{Ca} регулируются различными факторами, которые могут изменять условия их открытия, чувствительность к Ca^{2+} и экспрессию субъединиц. С увеличением возраста экспрессия и функции BK_{Ca} изменяются [3]. В силу того, что у старых животных открыто больше K^+-каналов, блокада этих каналов, предотвращая диссипацию электрического сигнала путем изменения сопротивления клеточной мембраны, может приводить к восстановлению и даже увеличению продольной проводимости сигнала, и, как следствие, к увеличению дилатации [24–26]. Показано [15], что активированные BK_{Ca} снижают эффективность проводимой дилатации. Из этого следует, что при ингибировании этих каналов проводимая дилатация будет усиливаться. Полученные нами данные показывают, что старение у крыс сопровождается изменением вклада BK_{Ca} в АХ-опосредованную дилатацию пиальных артерий диаметром более 20 мкм. Уже с 6-месячного возраста и в процессе дальнейшего старения крыс эти каналы практически не участвуют в дилататорном ответе крупных артерий на воздействие АХ (диаметром > 40 мкм).

У 9- и 24-месячных крыс блокада BK_{Ca} приводит к уменьшению числа АХ-индуцированных дилатаций средних сосудов (20–40 мкм) в значительно большей степени, чем у 4-месячных животных, что свидетельствует об увеличении вклада этих каналов в дилатацию средних артерий. Это, возможно, является компенсаторным механизмом регуляции притока и перераспределения крови в условиях нарушения регуляции тонуса крупных артерий. Число дилатаций мелких артерий у 6- и 18-месячных крыс на фоне блокады BK_{Ca} было больше по сравнению с аналогичными показателями у 4-месячных крыс, т.е. на фоне блокады BK_{Ca} снижение числа дилатаций мелких артерий у 6- и 18-месячных крыс выражено в меньшей степени, чем у 4-месячных, что указывает на снижение вклада этих каналов в дилатацию мелких артерий (< 20 мкм). Таким образом, можно говорить о зависимости вклада BK_{Ca} в регуляцию дилатации пиальных артерий как от возраста, так и от калибра сосудов.

Заключение

Можно констатировать, что дилатация пиальных артерий крыс Wistar в возрасте 4–24 мес. зависит от начального диаметра сосуда. Значительную роль в АХ-опосредованной дилатации этих сосудов играют BK_{Ca}. Возрастные нарушения вклада этих каналов в АХ-опосредованную дилатацию пиальных артерий развиваются постепенно и имеют волнообразное течение. По сравнению с 4-месячными крысами у 6- и 18-месячных снижается вклад BK_{Ca} в дилатацию пиальных артерий диаметром менее 20 мкм. Изменения регуляции пиальных артерий диаметром 20–40 мкм проявляются в увеличении вклада BK_{Ca} в дилатацию этих сосудов у 9- и 24-месячных крыс по сравнению с 4-месячными. Также с возрастом снижается вклад BK_{Ca} в дилатацию артерий диаметром более 40 мкм: уже у 6-месячных крыс, они практически не участвуют в дилататорном ответе на воздействие АХ. Выявленные нарушения функциональной активности калиевых каналов могут служить терапевтическими мишенями для создания новых технологий лечения возрастных поражений церебральных сосудов.

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания Института физиологии имени И.П. Павлова РАН (№1021062411784-3-3.1.8). Все процедуры, выполненные на животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии имени И.П. Павлова РАН (протокол № 12/26 от 26.12.2022 г.). Все международные, национальные и/или институциональные принципы содержания и использования животных были соблюдены. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мадьянова В.В. Болезни системы кровообращения у пожилых в России: динамика показателей заболеваемости и смертности. *Пробл. стандарт. здравоохр.* 2020;(11–12):44–52.
2. Chennupati R., Lamers W.H., Koehler S.T., De Mey G.R. Endothelium-dependent hyperpolarization-related relaxations diminish with age in murine saphenous arteries of both sexes. *Br. J. Pharmacol.* 2013;169(7):1486–1499.
3. Carvalho-de-Souza J.L., Varanda W.A., Tostes R.C., Chignalia A.Z. BK Channels in cardiovascular diseases and aging. *Aging Dis.* 2013;4(1):38–49.
4. Tykocki N.R., Boerman E.M., Jackson W.F. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Compr. Physiol.* 2017;7(2):485–581.
5. Tanaka Y., Koike K., Toro L. Maxi K channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *J. Smooth Muscle Res.* 2004;40(4–5):125–153.
6. Jackson W.F. Calcium-dependent ion channels and the regulation of arteriolar myogenic tone. *Front. Physiol.* 2021;12:770450.
7. Hofmann F., Bernhard D., Lukowski R., Weinmeister P. cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 191.* Eds. H.H.H.W. Schmidt, F. Hofmann and J.P. Stasch. Berlin; Heidelberg: Springer; 2009:137–162.
8. Serviente C., Berry C.W., Kenney W.L., Alexander L.M. Healthy active older adults have enhanced K^+ channel-dependent endothelial vasodilatory mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2020;319(1):R19–R25.
9. Schmid J., Müller B., Heppeler D., Gaynullina D., Kassmann M., Gagov H., Mladenov M., Gollasch M., Schubert R. The unexpected role of calcium-activated potassium channels: limitation of NO-induced arterial relaxation. *J. Am. Heart Assoc.* 2018;7(7):e007808.
10. Shuvaeva V.N., Gorshkova O.P. Contribution of IK_{Ca}-channels to dilatation of pial arteries in young rats after ischemia/reperfusion. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2022;58(6):1926–1936.
11. Sandow S.L., Senadheera S., Grayson T.H., Welsh D.G., Murphy T.V. Calcium and endothelium-mediated vasodilator signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;740:811–831.
12. Шуваева В.Н., Горшкова О.П. Модуляция тонуса церебральных артерий ацетилхолином у крыс разных линий. *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2018;104(7):807–816.
13. Davis C.M., Siler D.A., Alkayed N.J. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: influence of sex, vessel size and disease state. *Womens Health (Lond.).* 2011;7(3):293–303.
14. Shuvaeva V.N., Gorshkova O.P. AgeRelated Changes in the contribution of nitric oxide and potassium channels to dilation of rat pial arteries. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2021;57(6):1408–1418.
15. Beleznai T.Z., Yarova P.L., Yuill K.H., Dora K.A. Smooth muscle Ca^{2+}-activated and voltagegated K^+ channels modulate conducted dilation in rat isolated small mesenteric arteries. *Microcircul.* 2011;18(6):487–500.
16. Черваев А.А., Буцких М.Г., Галагудза М.М. Механизмы нейрососудистого сопряжения. *Рег. кровообр. микроциркул.* 2023;22(2):67–73.
17. Zuccolo E., Lim D., Kheder D.A., Perna A., Catarsi P., Botta L., Rosti V., Riboni L., Sancini G., Tanzi F., D'Angelo E., Guerra G., Moccia F. Acetylcholine induces intracellular Ca^{2+} oscillations and nitric oxide release in mouse brain endothelial cells. *Cell Calcium.* 2017;66:33–47.
18. Gorshkova O.P. Age-related changes in the indices of cerebral blood flow velocity in rats. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2022;58(3):894–900.
19. Gorshkova O.P. Changes in rat cerebral blood flow velocities at different stages of aging. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2023;59(2):569–576.
20. Krüger-Genge A., Blocki A., Franke R.P., Jung F. Vascular endothelial cell biology: An update. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(18):4411.
21. Mitchell J.A., Kirkby N.S. Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* 2018;176(8):1038–1050.
22. Иванов А.Н., Попыхова Э.Б., Терешкина Н.Е., Степанова Т.В., Злобина О.В., Норкин И.А. Вазомоторная функция эндотелия. *Усп. физиол. наук.* 2020;51(4):82–104.
23. Lang M.G., Paterno R., Faraci F.M., Heistad D.D. Mechanisms of adrenomedullin-induced dilatation of cerebral arterioles. *Stroke.*1997;28(1):181–185.
24. Sobey C.G., Heistad D.D., Faraci F.M. Potassium channels mediate dilatation of cerebral arterioles in response to arachidonate. *Am. J. Physiol.* 1998;275(5):H1606–H1612.
25. Behringer E.J., Shaw R.L., Westcott E.B., Socha M.J., Segal S.S. Aging impairs electrical conduction along endothelium of resistance arteries through enhanced Ca^{2+}-activated K^+ channel activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013;33(8):1892–1901.
26. Behringer E.J., Segal S.S. Tuning electrical conduction along endothelial tubes of resistance arteries through Ca^{2+}-activated K^+ channels. *Circ. Res.* 2012;110(10):1311–1321.

Поступила в редакцию 04.10.2023
После доработки 05.03.2024
Принята в печать 16.03.2024

RESEARCH ARTICLE

Role of BK_{Ca} channels in pial vessel dilation in rats of different ages

V.N. Shuvaeva*, O.P. Gorshkova

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Makarov emb., 6, St. Petersburg, 199034, Russia
**e-mail: shuvaevavn@infran.ru*

Studying the mechanisms of age-related changes in vascular reactions and applying the acquired knowledge in the clinic can help reduce complications and mortality from diseases of the cardiovascular system, the frequency of which increases with age. This study is important

because with aging, endothelial dysfunction increases and cerebral circulation disorders caused by the occurrence of ischemic foci are observed. One of the main elements in the regulation of vascular tone, along with many important mechanisms, are potassium ion channels. In this work, we studied age-related changes in the role of calcium-activated potassium channels (BK_{Ca}) in acetylcholine-mediated dilatation of cerebral arteries in Wistar rats, since their contribution to vasodilation in aging is poorly understood. Using intravital microphotography (×470), we compared the responses of pial arteries to acetylcholine chloride (ACh, 10^{-7} M, 5 min) in the absence and against the background of BK_{Ca} blockade with tetraethylammonium chloride (TEA, 2 mM, 5 min) in aged Wistar rats 4, 6, 9, 18 and 24 months. Changes in the contribution of BK_{Ca} to vascular dilatation were assessed by changes in the number of dilatations of the pial arteries on the exposure to ACh after BK_{Ca} blockade, measuring the width of vessels in 3 separate groups of arteries: small (with a diameter of less than 20 μm), medium (20–40 μm) and large (more than 40 μm). It has been shown that ACh-induced dilatation depends on the initial diameter of the arteries. Inhibition of BK_{Ca} activity in 4-month-old rats reduces the number of ACh-induced dilatations in all groups of arteries studied. Compared to 4-month-old rats, in 6- and 18-month-old rats the contribution of BK_{Ca} channels to the dilatation of small arteries is reduced, in 9- and 24-month-old rats the contribution of BK_{Ca} channels to the dilatation of medium arteries is increased; the contribution of BK_{Ca} to the dilatation of large arteries decreases starting from 6 months of age. Dilatation of the pial arteries of Wistar rats at the age of 4–24 months depends on the initial diameter of the vessel. BK_{Ca} play a significant role in ACh-mediated dilatation of these vessels. Age-related impairments in the contribution of these channels to ACh-mediated dilatation of pial arteries develop gradually, have a wave-like course and depend on the diameter of the arteries. The identified disturbances in the functional activity of the BK_{Ca} can serve as therapeutic targets for the creation of new technologies for the treatment of age-related lesions of cerebral vessels.

Keywords: *aging, pial arteries, vasodilation, acetylcholine, calcium-activated potassium channels of large conductance, vascular smooth muscle cells*

Funding: This study was supported by the State funding allocated to the Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences (N 1021062411784-3-3.1.8).

Сведения об авторах

Шуваева Вера Николаевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Тел.: 8-813-707-25-53; e-mail: shuvaevavn@infran.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8517-7467.

Горшкова Оксана Петровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Тел.: 8-813-707-25-53; e-mail: gorshkovao@infran.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8026-6161.

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.044+579.695

Краситель 10-N-нонилакридиновый оранжевый как флуоресцентный индикатор действия антисептика октенидина на мембраны хроматофоров *Rhodobacter sphaeroides*

Е.П. Лукашев[1], П.П. Нокс[1], М.Г. Страховская[2,*], В.З. Пащенко[1]

[1]Кафедра биофизики и [2]кафедра синтетической биологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

[*]e-mail: maristra@yandex.ru

Возрастающие объемы производимых антисептиков и дезинфектантов, которые широко применяются в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности и быту, после использования могут представлять серьезную экологическую проблему. Ранее при изучении действия ряда антисептиков в микромолярных концентрациях мы выявили нарушения функционирования фотосинтетических мембран и выделенных из них фототрансформирующих пигмент-белковых комплексов у разных представителей фотосинтезирующих организмов. В настоящей работе для определения чувствительности фотосинтетических мембран к действию катионного антисептика октенидина использованы хроматофоры пурпурных несерных бактерий *Rhodobacter sphaeroides*, меченные флуоресцентным красителем 10-N-нонилакридиновым оранжевым (НАО). Показано, что связывание НАО с хроматофорами сопровождается сдвигом максимума излучения красителя от 525 к 640 нм. «Красная» флуоресценция связанного с хроматофорами НАО оказалась чувствительна к действию на фотосинтетические мембраны октенидина в возрастающих концентрациях. Установлены концентрации антисептика, при которых он приводит к деградации структур хроматофоров и изменению агрегатного состояния НАО, что можно обнаружить по усилению «зеленой» флуоресценции в спектрах излучения красителя. Обсуждаются свойства НАО в качестве флуоресцентного индикатора функционального состояния фотосинтетических мембран и потенциальных изменений, которые могут происходить в таких системах под влиянием катионного антисептика.

Ключевые слова: *пурпурные несерные бактерии, хроматофоры, фотосинтетические мембраны, флуоресценция, 10-N-нонилакридиновый оранжевый, антисептик октенидин*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-1-2

Введение

Антисептиками называют противомикробные средства широкого спектра действия для обеззараживания кожи, слизистых, раневых поверхностей. В настоящее время антисептики активно используются не только в здравоохранении и ветеринарной медицине, но также в быту для обработки кожи рук и как компоненты зубных паст, ополаскивателей полости рта и других средств личной гигиены [1, 2]. Свой вклад в массовое применение антисептиков и рост их производства внесла и пандемия COVID-19. В качестве действующего вещества антисептики могут содержать йод, пероксид водорода, спиртовые компоненты и др. Высокой эффективностью обладают катионные антисептики [3] на основе бигуанидов (хлоргексидин) и четвертичных аммониевых соединений (ЧАС), в частности, бензалкония хлорид и октенидин. ЧАС также широко используются в составе дезинфектантов для обеззараживания поверхностей [4].

После использования антисептики и дезинфектанты наиболее часто попадают непосредственно в сточные воды. Так, в сточных водах медицинских учреждений концентрация хлоргексидина может достигать 10,3 мкг/мл, а в бытовых водах– 4,5 мкг/мл [5]. По оценке, сделанной ранее [6], до 25% используемых ЧАС сбрасываются непосредственно в окружающую среду, загрязняя поверхностные воды, осадочные материалы водоемов и почву, а 75% поступает в системы очистки сточных вод, в большинстве своем не предназначенные для удаления такого рода микропримесей. Они оказывают негативное действие на активный ил, способствуют выработке перекрестной устойчивости входящих в него микроорганизмов [7], накапливаются в осадках очистных сооружений [8].

© Лукашев Е.П., Нокс П.П., Страховская М.Г., Пащенко В.З., 2024

С загрязненными сточными водами и осадками очистных сооружений антисептики и дезинфектанты попадают в окружающую среду, где лишь частично подвергаются биодеградации [9]. Показано, что хлоргексидин вызывает уменьшение доли биомассы зеленых водорослей и цианобактерий в речной воде [10], а ЧАС, накапливаясь в осадочных материалах [11], уменьшают видовое разнообразие в микробных сообществах.

Очевидно, с течением времени в окружающей среде будут накапливаться все большие количества антисептических средств с длительным временем жизни, способностью к биоаккумуляции и высокой экотоксичностью, что требует повышенного внимания к этой проблеме и постоянного мониторинга. В этой связи представляет безусловный интерес поиск индикаторов функционального состояния биомембран при воздействии на них такого рода соединений.

В цикле работ [12–15] мы исследовали влияние катионных антисептиков (хлоргексидин, пиклоксидин, мирамистин, октенидин) в микромолярных концентрациях на фотосинтетические мембраны и изолированные из них фототрансформирующие пигмент-белковые комплексы разных представителей фотосинтезирующих организмов – от пурпурных бактерий до цианобактерий и высших растений. В частности, пурпурные несерные бактерии, хроматофоры которых могут служить удобным объектом тестирования воздействия антисептиков на аппарат фотосинтеза, являются факультативно аэробными фотоорганогетеротрофными грамотрицательными бактериями, которые, осуществляя аноксигенный фотосинтез, используют в качестве доноров электронов органические соединения. Они обитают в илистой почве, богатых органикой водоемах, осадках сточных вод, входят в состав активного ила [16], то есть присутствуют там, где высока вероятность накопления дезинфектантов и антисептиков.

В результате воздействия антисептиков было выявлено нарушение функциональных процессов переноса световой энергии между мембранносвязанными светособирающими комплексами (ССК), доставки энергии возбуждения к собственно фотосинтетическим реакционным центрам (РЦ), процессов переноса электронов в РЦ фотосистемы 1, эффективности работы кислородвыделяющего комплекса фотосистемы 2. При этом при общем сходстве вызываемых эффектов наиболее ярко выраженное воздействие наблюдалось у октенидина.

Результатом обнаруженного нами воздействия антисептиков были и очевидные структурные нарушения в фотосинтетических мембранах и мембранносвязанных пигмент-белковых комплексах. Появление продуктов деградации бактериохлорофилла (Бхл) в виде бактериофеофитина [12, 13] и молекул свободного мономерного хлорофилла [14, 15] свидетельствуют уже о разрушении этих мембран и их фототрансформирующих комплексов в присутствии антисептика в высоких концентрациях. В дальнейшем развитии этих исследований представляет интерес использование индикаторов структурного состояния фотосинтетических мембран, которые отражали бы состояние гидрофобных областей изучаемых объектов при воздействии на них антисептиков, в том числе при умеренных концентрациях последних, еще не вызывающих очевидной деградации мембран. В этой связи привлекает внимание возможность использования в данных целях флуоресцентного красителя 10-N-нонилакридинового оранжевого (НАО), который уже давно применяется в качестве селективного индикатора кардиолипина в биомембранах. Считают, что НАО способен связываться с отрицательно заряженными липидами не только благодаря зарядовому взаимодействию и водородной связи с полярной головкой липида, но также и благодаря гидрофобным взаимодействиям, обусловленным длинным ацильным хвостом НАО. При этом именно гидрофобные взаимодействия играют, по-видимому, превалирующую роль [17–19].

В настоящей работе мы исследовали влияние наиболее «эффективного» в группе изучаемых нами катионных антисептоков октенидина на мембраны хроматофоров пурпурных несерных бактерий *Rhodobacter sphaeroides*, меченных НАО.

Материалы и методы

Выращивание бактерий *R. sphaeroides* дикого типа и выделение из клеток хроматофоров проводили, как описано ранее [20]. Хроматофоры, представляющие собой замкнутые везикулярные частицы, суспендировали в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,5) и хранили при температуре -20 °C. Перед экспериментом хроматофоры разводили буфером до концентрации порядка 0,05 мкМ (поглощение суспензии хроматофоров при 850 нм находилось в пределах 0,35–0,4 ед. о. п.). Для расчета числа хроматофорных частиц в растворе использовали величину поглощения при 850 нм и соответствующий этой полосе коэффициент молярной экстинкции ССК LH2, равный 132 $мМ^{-1}см^{-1}$ [21], а также известное среднее число этих периферических комплексов в одном хроматофоре, равное 63 [22].

Спектры поглощения регистрировали с помощью модифицированного спектрофотометра Hitachi-557 (Hitachi, Япония), а спектры флуоресценции – с использованием спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba-Jobin-Yvon, Франция). Возбуждение флуоресценции проводили при 430 нм. Кинетику затухания флуоресценции регистрировали методом время-коррелированного счета фотонов (time-correlated single-photon counting, TCSPC) при возбуждении светодиодом (NanoLED) с длиной волны 390 нм и длительностью импульса 0,8 нс.

В качестве источника катионного антисептика октенидина служил коммерческий препарат «Октенисепт» (Schulke & Mayr, Германия), содержащий 0,1% дигидрохлорида октенидина и 2% феноксиэтанола. Предварительные эксперименты показали, что компонент препарата «Октенисепт» феноксиэтанол в эквимолярных концентрациях сам по себе не влияет на спектральные свойства НАО и исследуемые параметры фотосинтетических мембран (данные не приведены).

В работе использовали флуоресцентный краситель НАО (Sigma-Aldrich, США). Непосредственно перед экспериментами с хроматофорами готовили исходный 30 мМ раствор НАО в этаноле, который затем доводили до значения концентрации красителя 5 мкМ натрий-фосфатным буфером. В отдельных экспериментах 30 мМ раствор НАО в этаноле хранили в течение месяца при температуре -80 °С, а перед измерениями его разводили буфером до концентрации 5–20 мкМ.

Эксперименты повторяли три раза. Для обработки результатов было использовано либо стандартное приборное программное обеспечение, либо программа OriginPro 9.1 (Origin Lab., США).

Результаты

Влияние октенидина на собственно флуоресцентные свойства НАО в растворах. НАО представляет собой липофильный флуоресцентный краситель, содержащий азотистый гетероцикл производного акридина, связанный с нонилацильной цепью. В миллимолярных концентрациях в этанольных и водно-метанольных растворах [23, 24] или микромолярных – в водном буфере с ЭДТА [25] – НАО имеет максимумы возбуждения флуоресценции при 495 нм и излучения – при 525 нм, характерные для акридинов в мономерной форме [26]. При концентрации в спиртовых растворах выше 100 мкМ акридиновые красители подвержены молекулярной агрегации – в первую очередь, с образованием Н-димеров. По сравнению с показателями мономерного акридина максимум возбуждения флуоресценции таких гомоагрегатов смещается на 22–25 нм в сторону более коротких длин волн, а максимум излучения – в «красную» область спектра [26]. По нашим наблюдениям, образование димеров НАО со сдвигом флуоресценции в «красную» область спектра может быть также результатом длительного хранения концентрированных растворов красителя в этаноле при низкой температуре (-80 °С). При последующем их разведении буфером до концентрации 20 мкМ и в спектре поглощения, и в спектре флуоресценции полосы димера заметно увеличиваются (в спектре поглощения увеличена коротковолновая полоса при 470 нм и уменьшена полоса мономера при 495 нм, а в спектре флуоресценции соответственно уменьшена полоса мономера при 527 нм и увеличена полоса димера при 635 нм) (рис. 1, А и Б, кривые 1). При снижении концентрации НАО до 5–10 мкМ относительная амплитуда полос поглощения димера при 470 нм и флуоресценции при 635 нм падает, что говорит об уменьшении степени димеризации красителя (кривые 2 и 3).

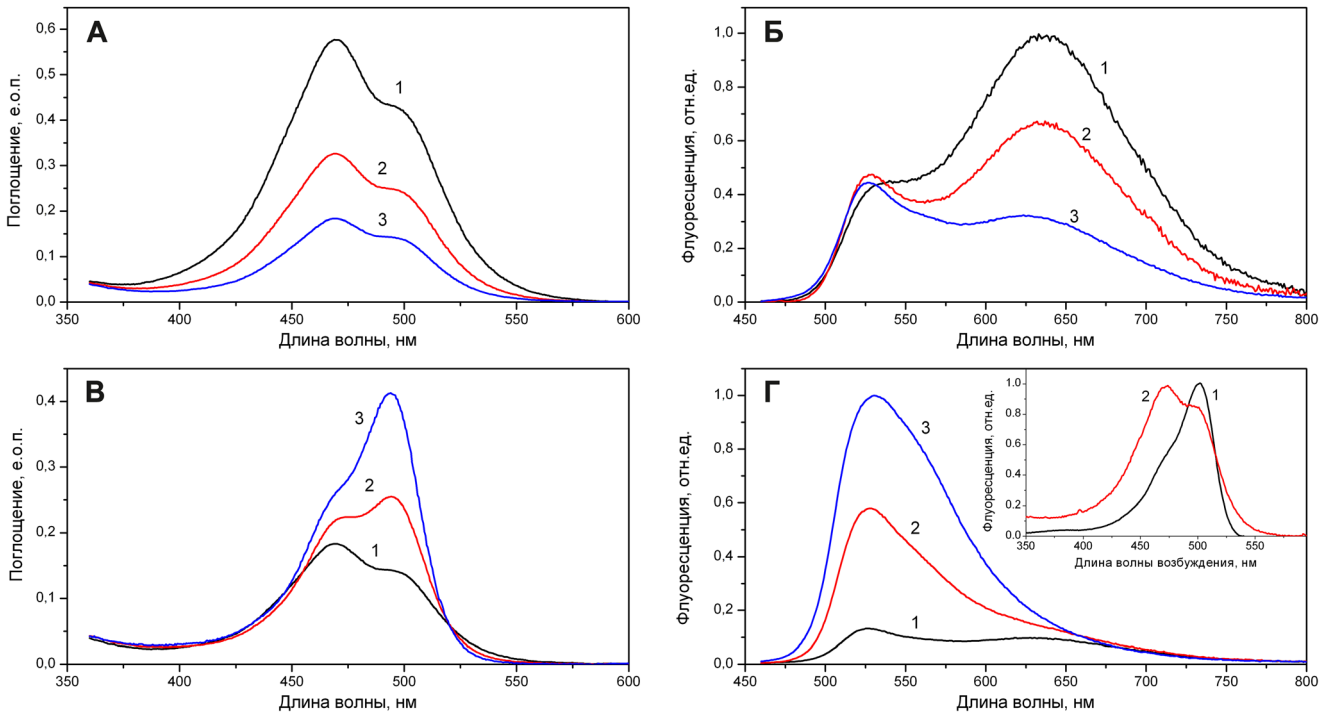


Рис. 1. Спектры поглощения (**А**) и флуоресценции (**Б**) НАО в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,8) в концентрации 20, 10 и 5 мкМ (кривые 1, 2 и 3 соответственно), а также спектры поглощения (**В**) и флуоресценции (**Г**) раствора 5 мкМ НАО в контроле и в присутствии октенидина в концентрации 30 и 100 мкМ (кривые 1, 2 и 3 соответственно). На вставке рисунка Г показаны спектры возбуждения флуоресценции при 550 нм (1) и 650 нм (2) для раствора 5 мкМ НАО в контроле без октенидина.

В спектре возбуждения флуоресценции преимущественно димеров НАО (при 650 нм) преобладает коротковолновая полоса около 470 нм, а в спектре возбуждения флуоресценции преимущественно мономеров (550 нм) – полоса около 500 нм (рис. 1, вставка на панели Д). Вместе с тем, эти полосы, характерные для димеров НАО, исчезают после добавления октенидина (рис. 1, В и Г), а также детергента Тритон Х-100 в концентрации порядка 0,1% (данные не показаны). Следует отметить, что октенидин вызывает дезагрегацию димеров в растворе НАО, начиная с самых низких концентраций в несколько микромолей, а при его концентрациях 100 мкМ и выше спектры НАО (рис. 1, В и Г, кривые 3) характерны для полностью мономерного состояния красителя. На рис. 1 хорошо видно, что и экстинкция, и интенсивность флуоресценции при мономеризации НАО значительно увеличиваются. Таким образом, октенидин в растворе с НАО разрушает агрегаты красителя, обладающие «красной» флуоресценцией, проявляя свое хорошо известное свойство катионного детергента.

Влияние октенидина на флуоресценцию НАО в суспензии хроматофоров. На рис. 2А приведены спектры флуоресценции раствора 5 мкМ НАО с хроматофорами в концентрации ~0,05 мкМ (кривая 1) и ~0,025 мкМ (кривая 2). В первом случае на одну везикулу приходится примерно 100 молекул красителя, а во втором – около 200 молекул. Как видно из рисунка, при соотношении НАО:везикула 200:1 наблюдается более интенсивное свечение в «красной» области, что свидетельствует о более высокой степени димеризации НАО.

На рис. 2Б показана эволюция спектра флуоресценции суспензии ~0,05 мкМ хроматофоров, содержащей 5 мкМ НАО, при добавлении октенидина в возрастающей концентрации. Видно, что в диапазоне концентраций октенидина до 60 мкМ (кривые 2–5) наблюдается рост интенсивности «красного» свечения НАО в области 600–650 нм, что, по-видимому, указывает на формирование зон с более высокой плотностью красителя. Как мы показали ранее [12], при этих концентрациях антисептика происходит также нарушение эффективности переноса световой энергии от светособирающих комплексов LH2 к коровому комплексу LH1-RC в хроматофорах *R. sphaeroides*. Полосы флуоресценции около 700 нм и 780 нм (рис. 2Б) могут принадлежать продуктам деградации Бхл, образующимся в результате воздействия антисептика.

При концентрации октенидина выше 60 мкМ вклад «красного» свечения НАО падает (рис. 2Б, кривые 6–9). Отметим, что, независимо от последовательности добавления НАО и октенидина к хроматофорам, при низкой концентрации антисептика наблюдалась увеличенная «красная» флуоресценция НАО, а при высокой концентрации – ее практически не было.

Значения зависимости отношения интенсивности «красной» и «зеленой» флуоресценции НАО (Фл630/Фл530) от концентрации октенидина показаны на рис. 3. Кинетика затухания флуоресценции НАО в буфере (кривая 1), в суспензии НАО с хроматофорами при концентрации октенидина 50 мкМ (кривая 2) и 140 мкМ (кривая 3) приведены на вставке рис. 3. Длительность флуоресценции составляла 1,19 ± 0,04 нс, 4,06 ± 0,05 нс и 1,22 ± 0,04 нс соответственно. Как было показано ранее [27], время жизни флуоресценции димера НАО много больше, чем мономера. Из приведенных нами спектрально-кинетических данных следует, что при концентрациях октенидина около 100 мкМ и выше флуоресценция НАО в суспензии хроматофоров фактически приближается к флуоресценции свободного НАО в растворе буфера. Свидетельством разрушающего действия антисептика является и существенное увеличение интенсивности свечения продуктов деградации Бхл в области 700 нм (рис. 2Б), а также падение экстинкции полос поглощения при 800, 850 и 875 нм (данные не приводятся). Кроме того, ранее на препаратах фотосистемы 2 мы показали, что и длительность флуоресценции хлорофилла при этом увеличивается до 5 нс – значения, характерного для мономерного состояния хлорофилла в растворе [14].

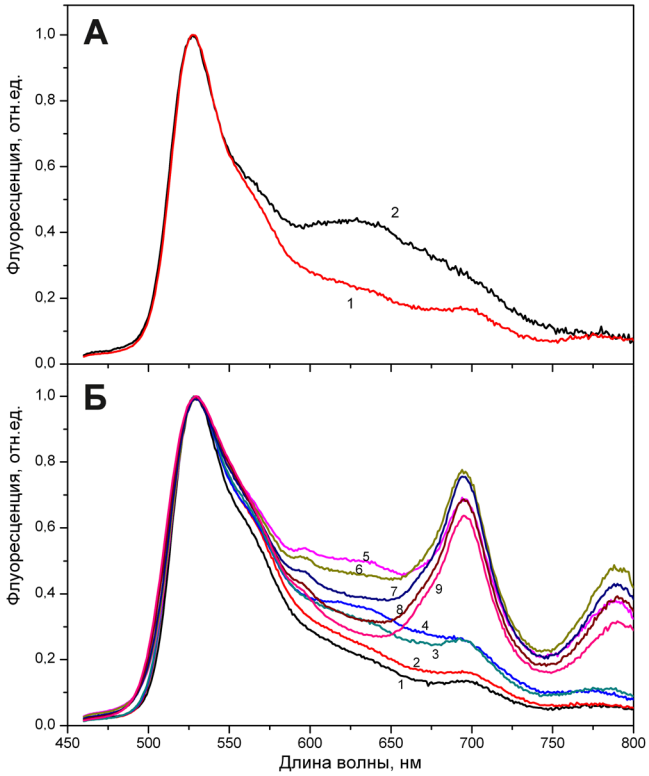


Рис. 2. Нормированные спектры флуоресценции НАО в присутствии хроматофоров без и с добавлением октенидина. **А** – Спектры флуоресценции 5 мкМ НАО в присутствии хроматофоров в концентрации ~0,05 мкМ (1) и 0,025 мкМ (2). **Б** – Спектры флуоресценции раствора 5 мкМ НАО в присутствии хроматофоров в концентрации ~0,05 мкМ в контроле (1) и в присутствии октенидина в концентрации 5, 20, 40, 50, 70, 90, 115 и 140 мкМ (кривые 2–9 соответственно).

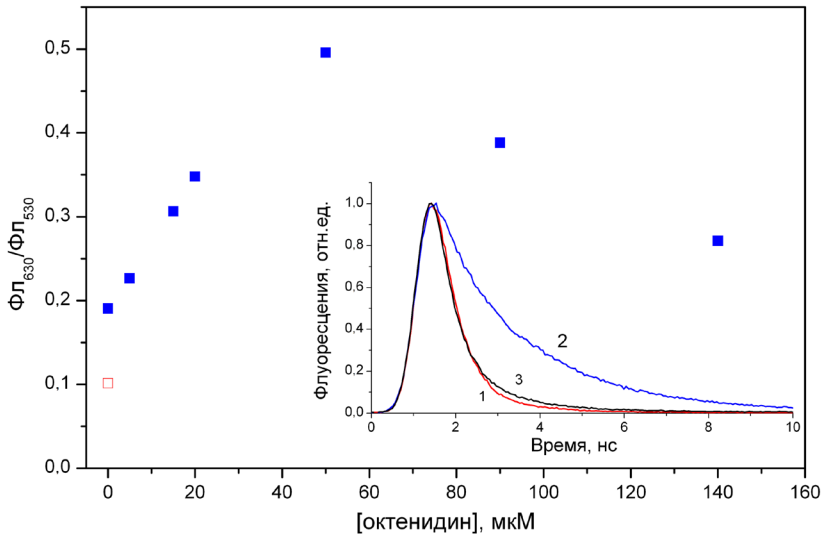


Рис. 3. Зависимость отношения интенсивности флуоресценции при 630 нм к таковой при 530 нм ($Фл_{630}/Фл_{530}$) для раствора 5 мкМ НАО в контроле без хроматофоров и октенидина (открытый квадрат) и для раствора НАО с хроматофорами от концентрации добавленного октенидина (закрытые квадраты). На вставке – кинетика затухания флуоресценции НАО при 530 нм в контроле (1), и в суспензии НАО с хроматофорами после добавления октенидина в концентрации 50 мкМ (2) и 140 мкМ (3).

Обсуждение результатов

Выделяемые из бактерий *R. sphaeroides* хроматофоры представляют собой замкнутые везикулярные частицы диаметром от 50 до 70 нм (в зависимости от условий выделения). Такая среднестатистическая частица включает в себя по имеющимся данным [22, 28] 63–67 периферических светособирающих комплексов LH2, 11 димерных LH1–RC–PufX и два мономерных LH1 – RC–PufX коровых комплекса, 4 димерных комплекса цитохром-*bc1* и две молекулы АТФ-синтазы. Пигментный комплекс содержит ~2500 молекул БХл и ~1550 молекул каротиноидов. Эти молекулы связаны с 9-субъединичными гетеродимерными белковыми комплексами LH2, 14–15-субъединичными гетеродимерными белковыми комплексами LH1, 3-субъединичными белковыми комплексами РЦ. Кроме того, в составе хроматофора находится подвижный липид-растворимый пул хинон/хинолов из примерно 900 молекул и порядка 16000 молекул фосфолипидов, формирующих мембранный бислой. Из этих фосфолипидов примерно половину составляют отрицательно заряженные кардиолипин (6–13%) и фосфатидилглицерол (36–44%) [29]. Остальная масса липидов приходится на фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин.

Известно, что хотя НАО обладает наиболее высокой степенью сродства к кардиолипину, этот краситель способен связываться и с другими отрицательно заряженными липидами [27, 30]. Таким образом, положительно заряженные молекулы НАО потенциально могут вступать в зарядовые взаимодействия с по крайней мере половиной липидов мембранного бислоя. Связываясь с мембраной, НАО может формировать гомодимеры [30, 31], а также сэндвич-подобные структуры, в которых две молекулы НАО располагаются с двух сторон полярной головки кардиолипина [27]. При этом наблюдается сдвиг спектра флуоресценции красителя из «зеленой» в «красную» область. При низких концентрациях НАО связывается с мембраной в мономерной форме, а также существует в свободной форме в растворе.

Ранее [27] был исследован механизм возникновения «красного» свечения (640 нм) в смеси НАО в концентрации порядка 25 мкМ с везикулами из различных липидов. Методом флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (fluorescence lifetime imaging, FLIM) было показано, что такая флуоресценция возникает в месте пограничного контакта двух везикул с молекулами НАО на их поверхностях. В другой работе [30] исследовалось изменение спектра флуоресценции НАО в постоянной концентрации 5 мкМ в Трис-буфере с возрастающей концентрацией липосом из разных липидов. Для всех липидов, кроме фосфатидилэтаноламина, было обнаружено, что при высоком содержании липосом наблюдается только «зеленая» флуоресценция, характерная для мономерного состояния красителя, тогда как при уменьшении числа липосом в суспензии, то есть увеличении числа молекул НАО на одну липосому, происходит сдвиг полосы флуоресценции НАО в сторону длинноволновой «красной» части спектра. Иными словами, чем выше плотность покрытия поверхности липосомы молекулами НАО, тем выше вероятность образования димеров НАО-НАО в месте контакта двух частиц. Как было показано микроскопически ранее [27], именно пограничное взаимодействие НАО из двух соседних слоев является причиной появления

«красной» флуоресценции. При этом квантовый выход флуоресценции димеров гораздо ниже, чем мономеров, что следует из значительного уменьшения интенсивности свечения НАО при уменьшении числа липосом (то есть росте отношения НАО/липид) в растворе. Таким образом, по ранее высказанному предположению [27], образование димеров НАО происходит в зоне контакта двух везикул, а «красная» полоса в спектре флуоресценции НАО, связанная с образованием его димеров, появляется только при достижении высокого отношения НАО/липосома. При наличии большого числа частиц с малым количеством сорбированного красителя образование пар НАО-НАО в результате взаимодействия липосом является редким событием. При более высокой плотности красителя на поверхности везикул в зоне контакта двух сферических частиц будет образовываться больше пар НАО-НАО. Наши данные с хроматофорами, которые также являются сферическими везикулярными частицами диаметром 50–70 нм, не противоречат этой гипотезе. Граничные взаимодействия между соседними молекулами НАО при агрегации хроматофорных везикул могут приводить к появлению «красного» свечения. Вероятность образования пар НАО-НАО в местах контакта соседних хроматофоров возрастает при высокой плотности молекул красителя на их поверхностях. Такие граничные взаимодействия в молекулах красителей, приводящие к «красному» сдвигу спектра флуоресценции, характерны и для многих других красителей [32]. Таким образом, наблюдаемый немонотонный ход интенсивности «красного» свечения НАО в присутствии октенидина можно описать следующим образом. При концентрациях октенидина до 60 мкМ происходит увеличение числа димеров НАО либо в зоне контактов между хроматофорами, либо непосредственно на поверхности хроматофора. Октенидин в более высокой концентрации вызывает разрушение образованных пар НАО-НАО за счет его поверхностно-активных свойств, что было показано нами для раствора НАО с исходно большим содержанием димеров.

Рассмотрим возможный механизм образования димеров НАО в мембране хроматофора в присутствии октенидина. Ранее мы показали, что все исследованные нами антисептики, которые оказывали влияние на функциональное состояние фотосинтетических мембран [12–15], имеют амфифильную природу с одновременным наличием в молекулах заряженных групп и гидрофобных участков. Но наибольшей «токсичностью» для фотосинтетических мембран обладал октенидин, в молекулах которого два положительно заряженных центра разделены 10-углеводородным линкером, также гидрофобные углеводородные «хвосты» располагаются по краям от этих зарядов. Такая структура, очевидно, способствует эффективным зарядовым и гидрофобным взаимодействиям с биомембранами, нарушая их нормальную структурно-функциональную организацию. В вычислительных экспериментах нами показано, что при взаимодействии с модельным бислоем [33] молекула октенидина принимает форму скобы с погруженными в гидрофобную часть мембраны ацильными «хвостами». При этом центральная часть молекулы, несущая два положительно заряженных центра и гидрофобный линкер, располагается в области заряженных головок фосфолипидов. При внедрении в липидный бислой октенидин при соотношениях антисептик:липид от 1:60 до 1:6 вызывал уменьшение толщины мембраны, увеличивал площадь мембраны, приходящуюся на молекулу липида, снижал коэффициенты латеральной диффузии фосфатидилглицерола и фосфатидилэтаноламина и параметр порядка ацильных цепей липидов. Последнее согласуется с данными [34] о сильном разупорядывающем действии октенидина на упаковку липидных цепей. Мы показали, что при взаимодействии НАО с модельным бислоем, имитирующим плазматическую мембрану грамотрицательных бактерий, краситель существует в форме мономера или в комплексах с отрицательно заряженными липидами. Как и в случае с катионным антисептиком, внедрение ацильного «хвоста» НАО в липидный бислой приводило к уменьшению коэффициентов латеральной диффузии мембранных липидов. В этих модельных экспериментах было зафиксировано образование сэндвич-подобных комплексов НАО с кардиолипином [35]. Появление таких агрегатов должно проявляться стимуляцией «красного» свечения.

В фотосинтетической мембране, где половина липидов отрицательно заряжена, даже небольшие концентрации катионного антисептика октенидина потенциально могут приводить к существенной дезорганизации процессов переноса световой энергии между светособирающими комплексами, в том числе – в результате изменения латеральной диффузии липидов в бислое вследствие зарядовых взаимодействий. Нами было показано, что в области умеренных концентраций антисептика (до ~60 мкМ) происходит блокирование миграции энергии от периферийного LH2-комплекса к коровому комплексу LH1-RC [12]. В настоящей работе мы обнаружили, что действие октенидина на взаимодействие между светособирающими комплексами в такой низкой концентрации коррелирует с увеличением выхода «красной» флуоресценции НАО. При высоких концентрациях октенидина (порядка 100 мкМ и более) уже происходит нарушение пигмент-белковых и пигмент-пигментных взаимодействий, что хорошо видно по увеличению свечения продуктов деградации Бхл и росту количества свободного мономерного Бхл [12]. То есть нативная структура пигмент-белкового комплекса и липидной матри-

цы хроматофора разрушается. При этом молекулы НАО фактически теряют связь с отрицательно заряженными головками липидов и переходят в раствор. Поскольку октенидин, обладая свойствами детергента, способен разрушать димеры НАО в растворе, краситель в этих условиях находится преимущественно в мономерном состоянии с «зеленым» свечением. Таким образом, НАО фактически является флуоресцентным индикатором состояния фотосинтетической мембраны и изменений, которые происходят в ней под влиянием катионного антисептика.

Заключение

В настоящей работе хроматофоры пурпурных несерных бактерий *R. sphaeroides* использовались в качестве платформы, с которой взаимодействовали катионный антисептик октенидин и производное акридина НАО. Основные результаты исследований показали, что краситель НАО чувствителен к состоянию фотосинтетической мембраны, которое менялось под действием октенидина. Антисептик в низкой концентрации вызывает увеличение количества димеров НАО за счет облегчения проникновения красителя в липидный бислой, однако при высоких концентрациях он разрушает нативную структуру всего пигмент-белкового комплекса, что сопровождается мономеризацией НАО. Последний процесс коррелирует с образованием продуктов деградации пигментного аппарата – бактериофеофитина и мономерного Бхл [12].

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7. Работы проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kampf G. Biocidal agents used for disinfection can enhance antibiotic resistance in gram-negative species. *Antibiotics*. 2018;7(4):e110.

2. Hübner N.O., Siebert J., Kramer A. Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2010;23(5):244–258.

3. Gilbert P., Moore L.E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* 2005;99(4):703–715.

4. Boyce J.M. Quaternary ammonium disinfectants and antiseptics: tolerance, resistance and potential impact on antibiotic resistance. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2023;12(1):e32.

5. Kodama H., Hashimoto T., Tsuruoka M., Kido Y., Uyeda M., Shibata M. Microbial degradation of disinfectants. IV. Treatment by activated sludge of chlorhexidine. *Eiseikagaku*. 1988;34:408–413.

6. Tezel U., Pavlostathis S.G. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2015;33:296–304.

7. Keerthisinghe T.P., Nguyen L.N., Kwon E.E., Oh S. Antiseptic chlorhexidine in activated sludge: Biosorption, antimicrobial susceptibility, and alteration of community structure. *J. Environ. Manage*. 2019;237:629–635.

8. Östman M., Lindberg R.H., Fick J., Björn E., Tysklind M. Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater. *Water Res.* 2017;115:318–328.

9. Linhartová L., Michalíková K., Šrédlová K., Cajthaml T. Biodegradability of dental care antimicrobial agents chlorhexidine and octenidine by ligninolytic fungi. *Molecules*. 2020;25(2):e400.

10. Lawrence J.R., Zhu B., Swerhone G.D.W., Topp E., Roy J., Wassenaar L.I., Rema T., Korber D.R. Community-level assessment of the effects of the broad-spectrum antimicrobial chlorhexidine on the outcome of river microbial biofilm development. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008;74(11):3541–3550.

11. Li X., Brownawell B. J. Quaternary ammonium compounds in urban estuarine sediment environments – A class of contaminants in need of increased attention? *Environ. Sci. Technol*. 2010;44(19):7561–7568.

12. Strakhovskaya M.G., Lukashev E.P., Korvatovskiy B.N., Kholina E.G., Seifullina N.Kh., Knox P.P., Paschenko V.Z. The effect of some antiseptic drugs on the energy transfer in chromatophore photosynthetic membranes of purple nonsulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynth. Res.* 2021;147(1):197–209.

13. Knox P.P., Lukashev E.P., Korvatovskiy B.N., Strakhovskaya M.G., Makhneva Z.K., Bol'shakov M.A., Paschenko V.Z. Disproportionate effect of cationic antiseptics on the quantum yield and fuorescence lifetime of bacteriochlorophyll molecules in the LH1RC complex of *R. rubrum* chromatophores. *Photosynth. Res.* 2022;153(1):103–112.

14. Paschenko V.Z., Lukashev E.P., Mamedov M.D., Korvatovskiy B.N., Knox P.P. Infuence of the antiseptic octenidine on spectral characteristics and energy migration processes in photosystem II core complexes. *Photosynth. Res.* 2023;155(1):93–105.

15. Paschenko V.Z., Lukashev E.P., Mamedov M.D., Gvozdev D.A., Knox P.P. Effect of cationic antiseptics on fluorescent characteristics and electron transfer in cyanobacterial photosystem I complexes. *Photosynth. Res.* 2023;159(2-3):241–251.

16. Liang C.-M., Hung C.-H., Hsu S.-C., Yeh I.-C. Purple nonsulfur bacteria diversity in activated sludge and its potential phosphorus-accumulating ability under different cultivation conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009;86(2):709–719.

17. Inmaculada M., Fernandez G., Ceccarelli D., Muscatello U. Use of the fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange in quantitative and location assays of cardiolipin: a study on different experimental models. *Anal. Biochem*. 2004;328(2):174–180.

18. Kaewsuya P., Danielson N.D., Ekhterae D. Fluorescent determination of cardiolipin using 10-N-nonyl acridine orange. *Anal. Bioanal. Chem*. 2007;387(8):2775–2782.

19. Mohr B., Shmilovich K., Kleinwachter I.S., Schneide D., Ferguson A.L., Bereau T. Data-driven discovery of cardiolipin-selective small molecules by computational active learning. *Chem. Sci.* 2022;13(16):4498–4511.

20. Knox P.P., Lukashev E.P., Korvatovskii B.N., Seifullina N.K., Goryachev S.N., Allakhverdiev E.S., Paschenko V.Z. Effect of dipyridamole on membrane energization and energy transfer in chromatophores of *Rba. sphaeroides*. *Biochemistry (Mosc.)*. 2022;87(10):1138–1148.

21. Clayton R.K., Clayton B. J. B850 pigment-protein complex of *Rhodopseudomonas sphaeroides*: Extinction coefficients, circular dichroism, and the reversible binding of bacteriochlorophyll. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 1981;78(9):5583–5587.

22. Niederman R.A. Photosynthesis in the Purple Bacteria. *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*. Ed. P.C. Hallenbeck. Springer Intern. Publ. AG; 2017:193–224.

23. Gallet P.F., Maftah A., Petit J.-M., Denis-Gay M., Julien R. Direct cardiolipin assay in yeast using the red fluorescence emission of 10-N-nonyl acridine orange. *Eur. J. Biochem*. 1995;228(1):113–119.

24. Kaewsuya P., Danielson N. D., Ekhterae D. Fluorescent determination of cardiolipin using 10-N-nonyl acridine orange. *Analyt. Bioanalyt. Chem*. 2007;387(8):2775–2782.

25. Petit J.M., Huet O., Gallet P.F., Maftah A., Ratinaud M.H., Julien R. Direct analysis and significance of cardiolipin transverse distribution in mitochondrial inner membranes. *Eur. J. Biochem*. 1994;220(3):871–879.

26. Shenderovich I.G. The partner does matter: The structure of heteroaggregates of acridine orange in water. *Molecules*. 2019;24(15):e2816.

27. Almendro-Vedia V.G., García C., Ahijado-Guzmán R., de la Fuente-Herreruela D., Muñoz-Úbeda M., Natale P., Viñas M.H., Albuquerque R.Q., Guerrero-Martínez A., Monroy F., Pilar Lillo M., López-Montero. Supramolecular zippers elicit interbilayer adhesion of membranes producing cell death. *Biochim. Biophys. Acta. General subjects*. 2018;1862(12):2824–2834.

28. Cartron M.L., Olsen J.D., Sener M., Jackson P.J., Brindley A.A., Qian P., Dickman M.J., Leggett G.J., Schulten K., Hunter C.N. Integration of energy and electron transfer processes in the photosynthetic membrane of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1837(10):1769–1780.

29. Nagatsuma S., Gotou K., Yamashita T., Yu L.-J., Shen J.-R., Madigan M.T., Kimura Y., Wang-Otomo Z.-Y. Phospholipid distributions in purple phototrophic bacteria and LH1-RC core complexes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2019;1860(6):461–468.

30. Oliver P.M., Crooks J.A., Leidl M., Yoon E.J., Saghatelian A., Weibel D.B. Localization of anionic phospholipids in *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol*. 2014;196(19):3386–3398.

31. Mileykovskaya E., Dowhan W., Birke R.L., Zheng D., Lutterodt L., Haines T.H. Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces. *FEBS Lett*. 2001;507(2):187–190.

32. Gadde S., Batchelor E.K., Weiss J.P., Ling Y., Kaifer A.E. Control of H- and J-aggregate formation via host-guest complexation using cucurbituril hosts. *J. Am. Chem. Soc*. 2008;130(50):17114–17119.

33. Kholina E.G., Kovalenko I.B., Bozdaganyan M.E., Strakhovskaya M.G., Orekhov P.S. Cationic antiseptics facilitate pore formation in model bacterial membranes. *J. Phys. Chem. B*. 2020;124(39):8593–8600.

34. Malanovic N., Ön A., Pabst G., Zellner A., Lohner K. Octenidine: Novel insights into the detailed killing mechanism of Gram-negative bacteria at a cellular and molecular level. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2020;56(5):e106146.

35. Kholina E., Kovalenko I., Rubin A., Strakhovskaya M. Insights into the formation of intermolecular complexes of fluorescent probe 10-N-nonyl acridine orange with cardiolipin and phosphatidylglycerol in bacterial plasma membrane by molecular modeling. *Molecules*. 2023;28(4):e1929.

Поступила в редакцию 10.10.2023
После доработки 05.03.2024
Принята в печать 21.03.2024

RESEARCH ARTICLE

Dye 10-N-nonyl acridine orange as a fluorescent indicator of the action of the antiseptic octenidine on the membranes of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores

E.P. Lukashev[1], P.P. Knox[1], M.G. Strakhovskaya[2, *], V.Z. Paschenko[1]

[1]Biophysics Department and [2]Synthetic Biology Department, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia
[*]e-mail: maristra@yandex.ru

Increasing volumes of produced antiseptics and disinfectants, which are widely used in medicine, veterinary medicine, the food industry and everyday life, can create a serious environmental problem after use. Previously, under the influence of micromolar concentrations of a number of antiseptics, we identified disturbances in the functioning of photosynthetic membranes and phototransforming pigment-protein complexes isolated from them in various representatives of photosynthetic organisms. In this work, to determine the sensitivity of photosynthetic membranes to the action of the cationic antiseptic octenidine, we used

chromatophores of the purple nonsulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides*, labeled with the fluorescent dye 10-N-nonylacridine orange (NAO). It was shown that the binding of NAO to chromatophores is accompanied by a shift in the dye emission maximum from 525 to 640 nm. The "red" fluorescence of NAO associated with chromatophores turned out to be sensitive to the effect of increasing concentrations of octenidine on photosynthetic membranes. We have found antiseptic concentrations which led to the degradation of chromatophore structures and change in the NAO aggregative state. It can be detected by an increase of "green" fluorescence in the emission spectra of the dye. The properties of NAO as a fluorescent indicator of the functional state of photosynthetic membranes and possible changes that can occur in such systems under the influence of a cationic antiseptic are discussed.

Keywords: *purple non-sulfur bacteria, chromatophores, photosynthetic membranes, fluorescence, 10-N-nonyl acridine orange, antiseptic octenidine*

Funding: The study was carried out within the framework of the scientific project of the state assignment of Moscow State University No. 121032500058-7.

Сведения об авторах

Лукашев Евгений Павлович – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-12-38; e-mail: lukashev@biophys.msu.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6853-6122

Нокс Петр Петрович – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-12-38; e-mail: knox@biophys.msu.ru

Страховская Марина Глебовна – докт. биол. наук, доц. кафедры синтетической биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-06; e-mail: maristra@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4571-0431

Пащенко Владимир Захарович – докт. физ.-мат. наук, рук. сектора кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-48-45; e-mail: vz.paschenko@gmail.com

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

CC BY NC

УДК 581.552

Функциональные признаки листьев и стратегии растений субальпийских вейниковых лугов северо-западного Кавказа

Т.В. Полошевец[1], В.Г. Онипченко[1, 2, *], Е.В. Сандалова[1], Т.М. Джатдоева[3], Т.Г. Елумеева[1]

[1]Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

[2]Тебердинский национальный парк, Россия, Карачаево-Черкесская Республика, 369210, г. Теберда, пер. Бадукский, д. 1;

[3]Медицинский институт, Северо-Кавказская государственная академия, Россия, Карачаево-Черкесская Республика, 369015, г. Черкесск, ул. Космонавтов, д. 100

[*]e-mail: vonipchenko@mail.ru

Анализ функциональных признаков растений и их стратегий – магистральное направление изучения механизмов формирования состава и структуры растительных сообществ. Сравнение средних по видам значений признаков со случайной выборкой местной флоры позволяет определить, насколько тот или иной признак важен для формирования состава сообщества. Сравнение средних и средневзвешенных значений показывает роль признака в доминировании. Целью работы было изучение роли функциональных признаков листьев и вклада CSR-стратегий Ф. Грайма (аббревиатура от названий трех стратегий: C – competitors, S – stress-tolerants, R – ruderals) в формировании наиболее распространенных на северо-западном Кавказе субальпийских вейниковых лугов. Надземная биомасса в этих сообществах – 384 ± 21 г/м² (среднее и его ошибка), масса ветоши прошлых лет – 393 ± 40 г/м². Доля злаков в сообществе 57,1 ± 2,9%, разнотравья – 32,9 ± 2,6%, бобовых– 8,9 ± 1,4%, осок и ситников – 1 ± 0,3%. Доминируют три вида: *Calamagrostis arundinacea* (26,5% от всей фитомассы), *Festuca varia* (23,3%), *Hedysarum caucasicum* (8%). Доминанты сообщества имеют бóльшую сухую массу листа, меньшее содержание воды в листе, меньшую удельную листовую поверхность. Компоненты сообщества характеризуются меньшей массой водонасыщенного листа, меньшей долей сухой массы и большей удельной листовой поверхностью, чем доминанты. Для доминантов и всех компонентов в сообществе характерен больший вклад стресс-толерантной стратегии, по сравнению со случайным значением.

Ключевые слова: функциональные признаки, экологические стратегии, субальпийские луга, Calamagrostis arundinacea, надземная биомасса, средневзвешенные значения

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-1-3

Введение

Функциональные признаки – это признаки, прямо или косвенно влияющие на приспособленность [1]. Существование видов в сообществе зависит от соответствия этих признаков абиотической и биотической среде, отбор видов в состав сообществ связан с этими признаками [2, 3]. Анализ функциональных признаков растений и их стратегий – магистральное направление изучения механизмов формирования состава и структуры растительных сообществ. Для оценки роли отдельных признаков используется сравнение средних по видам значений признаков со случайной выборкой местной флоры, что позволяет определить, насколько тот или иной признак важен для формирования состава сообщества. В качестве местной флоры взято большинство растений альпийского пояса Тебердинского нацпарка, выявленных с помощью базы данных [4]. С другой стороны, сравнение средних и средневзвешенных значений показывает роль признака для доминирования в том или ином сообществе [5].

Функциональные признаки растений можно разделить на первичные (непосредственно измеряемые – например, высота растений, толщина и масса листа) и вторичные, которые рассчитываются на базе первичных (например, удельная листовая поверхность – УЛП – площадь на единицу массы листа). Особое место занимают комбинированные признаки, среди которых часто

© Полошевец Т.В., Онипченко В.Г., Сандалова Е.В., Джатдоева Т.М., Елумеева Т.Г., 2024

используют относительный вклад CSR-стратегий (аббревиатура от названий трех стратегий: конкуренты – competitors; стресс-толеранты – stress-tolerants; рудералы – ruderals) системы Раменского-Грайма [6, 7], количественная оценка которых возможна на базе методики С. Пирса с соавт. [8]. В работе В.Г. Онипченко и др. [9] была проверена гипотеза о том, что в альпийских сообществах, при общей склонности растений к S-стратегии, в разных ландшафтах повышается роль других стратегий. Так, на продуктивных лугах (гераниево-копеечниковые луга) относительно большую роль играет С-стратегия, а в сообществах с коротким вегетационным периодом (альпийские ковры) – R-стратегия [9].

Для изучения функционального состава растительных сообществ необходимо иметь два набора данных: 1) детальная оценка участия видов растений в сообществе, 2) значения функциональных признаков для растений, образующих сообщество, а также большинства растений местной флоры. Целью настоящей работы было изучение роли функциональных признаков листьев и вклада CSR-стратегий в формировании наиболее распространенных на Северо-Западном Кавказе естественных субальпийских вейниковых лугов. Задачами работы было произвести оценку биомассы этих сообществ в Тебердинском национальном парке, выявить видовую структуру, измерить функциональные признаки листьев (площадь листа, УЛП, масса листа в водонасыщенном и сухом состоянии), рассчитать эколого-ценотические стратегии видов, а также оценить механизмы формирования сообщества за счет сравнения случайных, средних и средневзвешенных значений признаков и стратегий.

Материалы и методы

Субальпийский пояс Кавказа располагается на высоте от 1900 до 2650 м над уровнем моря и граничит с альпийским поясом по верхней границе и с верхнегорным лесным поясом – по нижней [10]. Он отличается благоприятным температурным режимом и интенсивным таянием снега весной. Это продлевает вегетационный период в понижениях рельефа, где накапливается снег, по сравнению с альпийским поясом [10]. Изученные субальпийские луга относятся к ассоциации *Betonici macranthae-Calamagrostietum arundinaceae* Onipchenko 2002. Они занимают в основном крутые склоны (7°–35°) южной экспозиции, с небольшой каменистостью и долей обнаженной почвы. Субальпийские луга этой ассоциации широко распространены в Тебердинском национальном парке и занимают 28,9% площади высокогорий (4867 га) [11].

Для оценки состава надземной фитомассы мы закладывали площадки размером 25 × 25 см, располагая их на случайном расстоянии от 1 до 7 м друг от друга вдоль трансект в субальпийском поясе горы Малая Хатипара и ее окрестностях в Тебердинском национальном парке. Каждая трансекта включала пять площадок и располагалась на высоте 2350–2650 м. Всего было собрано 100 укосов (35 укосов в 2020 г. и 65 – в 2021 г.), которые затем были разобраны по видам и взвешены. Бумажные пакеты сушили сначала на воздухе, а затем в сушильном шкафу (8 ч при 80 °C), сухую биомассу взвешивали на весах с точностью до 0,1 мг. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA в программе STATISTICA 8 по массам видов в разные годы показал, что между укосами 2020 г. и 2021 г. нет статистической разницы ($p = 0{,}538$), поэтому все укосы обрабатывали единым массивом.

Измерение функциональных признаков было произведено для 102 видов, найденных в укосах, по 10 листьев на один вид.

Для измерения площади листа мы брали полностью раскрывшиеся листья без следов патогенов и болезней. В полевых условиях срезали подходящий побег либо отдельный лист, которые помещали в полиэтиленовый пакет. До момента измерения в лаборатории побег или лист помещали в сосуд с водой, закрывали полиэтиленовым пакетом и ставили в холодильник на 6–8 ч для насыщения водой. Лист без черешка взвешивали и сканировали для измерения его площади с помощью программы ImageJ. Для измерения сухой массы лист высушивали в сушильном шкафу при температуре 80 °C 8 ч, затем сухой лист взвешивали. УЛП рассчитывали как площадь листа, деленную на массу сухого листа. Также мы рассчитали процент сухой массы в листе от полной массы листа.

Для определения стратегий растений мы использовали площадь листа, массу сухого листа и массу насыщенного водой листа. В программе «StrateFy – The global vascular plant CSR strategy calculator tool» [8] по нашим данным о трех функциональных признаках растений мы вычисляли процентное соотношение CSR-стратегий для всех видов. Для полученных данных нашли случайное, среднее и средневзвешенное значения признаков в сообществе. Средневзвешенное значение рассчитывали на основании вклада биомассы («вес» вида) и значений признаков [12].

Случайные значения для признаков и стратегий мы рассчитывали в программе R-Studio 4.3.1 (R Core Team, 2021). Для этого мы создавали список, включающий весь набор значений признака или стратегии, а также список с числом видов на каждой из 100 площадок. Затем, с помощью функции sample(), из этого списка случайно брали значения, число которых было равно числу видов на площадке. Таким образом мы получали случайное значение признака для каждой площадки, которое затем сравнивали со средним и средневзвешенным значениями.

В программе R-Studio мы провели сравнение случайных, средних и средневзвешенных значений для трех стратегий (S, C, R) и пяти признаков (сухая и влажная масса листа, содержание сухого вещества в листе, УЛП, площадь листа), а также нашли среднее для случайных значений этих признаков. С помощью теста Шапиро shapiro.test() провели проверку на соответствие распределения нормальному. При нормальном распределении сравнение случайных, средних и средневзвешенных проводили с помощью теста Тьюки, в других случаях использовали тест Уилкоксона с поправкой Бонферрони для устранения проблемы множественных проверок.

Результаты

Средняя надземная фитомасса (масса сосудистых растений, мхов и ветоши прошлых лет) на площадке составляла 777 ± 50 г/м² (среднее значение ± ошибка среднего, n = 100), общая надземная биомасса (масса сосудистых растений и мхов) – 384 ± 21 г/м², масса ветоши прошлых лет (ВПЛ) – 393 ± 40 г/м², масса сосудистых растений – 383 ± 21 г/м², масса мхов – 0,85 ± 0,26 г/м². Эпигейные лишайники полностью отсутствовали. Всего обнаружено 105 видов сосудистых растений, в среднем в укосе встречалось 10 ± 0,3 видов растений. Зависимости между биомассой на площадке и числом видов не обнаружено (коэффициент корреляции Спирмена $\rho = -0{,}096$, $p = 0{,}342$). Доля злаков в сообществе составила 57,1 ± 2,9%, разнотравья – 32,9 ± 2,6%, бобовых – 8,9 ± 1,4%, осок и ситников – 1,0 ± 0,3%. Есть положительная зависимость между фитомассой на площадке и долей злаков и отрицательная – между фитомассой и долей разнотравья (коэффициент корреляции Спирмена $\rho = 0{,}34$, $p < 0{,}001$ и $\rho = -0{,}321$, $p < 0{,}001$).

На субальпийских лугах 80% всей фитомассы образуют 13 видов из 105: *Calamagrostis arundinacea* (L.) Roth (26,5%), *Festuca varia* Haenke (23,3%), *Hedysarum caucasicum* M. Bieb. (8%), *Pulsatilla aurea* (Sommier & Levier) Juz. (3,9%), *Poa longifolia* Trin. (3,7%), *Betonica macrantha* K. Koch (2,8%), *Agrostis vinealis* Schreb. (2,3%), *Trollius ranunculinus* (Sm.) Stearn (2,2%), *Anemone narcissiflora* L. (2,2%), *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin. (1,8%), *Bupleurum falcatum* L. (1,7%), *Geranium sylvaticum* L. (1,5%), *Veratrum album* L. (1,5%). Только три первых вида, образующие более 5% биомассы, можно считать доминантами сообщества [13].

При сравнении случайных и средних значений признаков оказалось, что среднее значимо выше случайного у массы сухого листа ($p = 0{,}015$) и процента сухого вещества в листе ($p < 0{,}001$), и ниже – у массы водонасыщенного листа ($p = 0{,}006$) и УЛП ($p < 0{,}001$). Не найдено значимых различий между случайными и средними величинами массы водонасыщенного листа и площади листа ($p = 0{,}428$). Средневзвешенное значение значимо отличается от среднего и выше у массы водонасыщенного листа ($p = 0{,}036$), массы сухого листа ($p = 0{,}002$) и процента сухой массы в листе ($p < 0{,}001$), а ниже – у УЛП ($p < 0{,}001$). Не было значимых различий между средними и средневзвешенными площади листа ($p = 0{,}125$) (рис. 1).

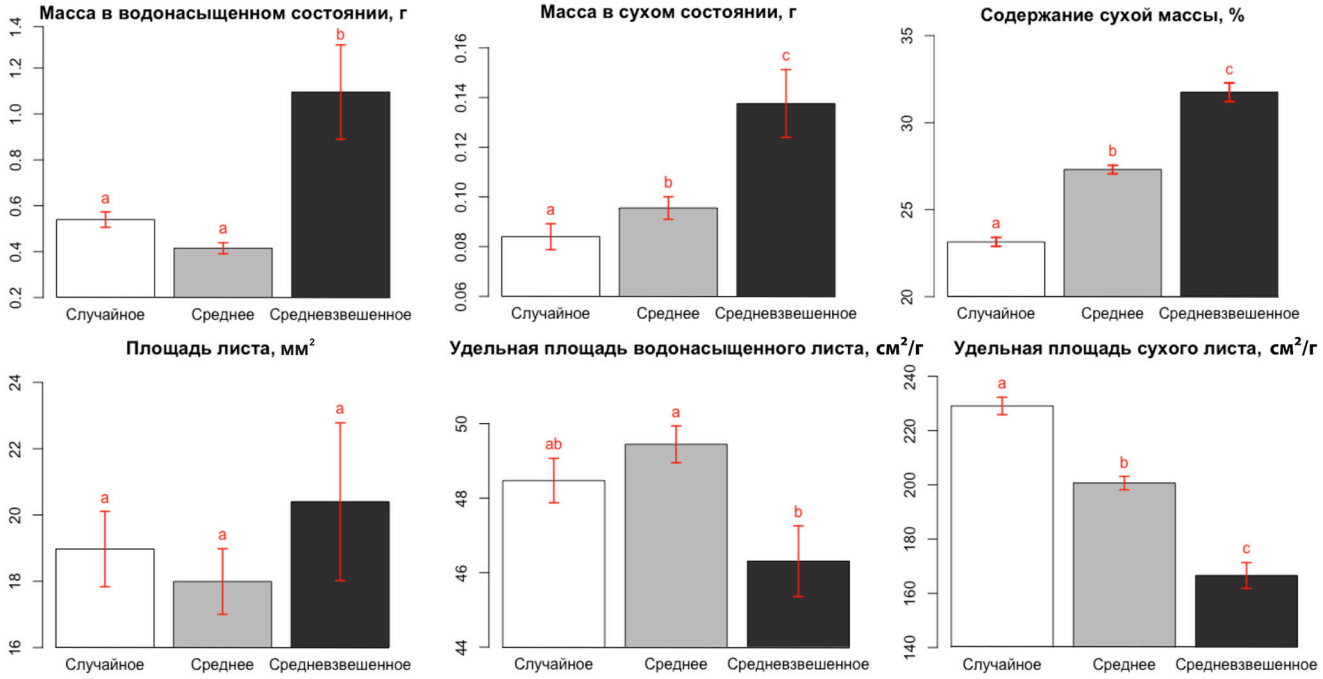


Рис. 1. Сравнение средних, средневзвешенных и случайных значений для шести функциональных признаков, n = 100. Усы – ошибка среднего. Разными буквами обозначены значимо отличающиеся варианты, одинаковые буквы говорят об отсутствии значимых отличий. При нормальном распределении сравнение проводили с помощью теста Тьюки, в других случаях использовали тест Уилкоксона с поправкой Бонферрони.

Средневзвешенные значения R-стратегии (19,8 ± 0,8%) были значимо ниже средних и случайных (31,5 ± 0,5% и 35,7 ± 0,6% соответственно), а средневзвешенные значения S-стратегии (51,8 ± 1,6%), напротив, были больше средних и случайных (46,6 ± 0,8% и 35,1 ± 0,8%). Для C-стратегии не было значимых отличий между всеми значениями (рис. 2). В целом, среди компонентов сообщества преобладает стресс-толерантная стратегия, так как выявлено такое распределение средних значений: S – 46,6 ± 0,8%, C – 29 ± 0,6%, R – 31,5 ± 0,5%.

Доминанты сообщества имеют следующие стратегии: *Calamagrostis arundinacea* (биомасса 101 г/м²) – S/CSR, *Festuca varia* (89 г/м²) – S, *Hedysarum caucasicum* (31 г/м²) – CR/CSR (рис. 3). Наиболее выраженная конкурентная стратегия отмечена у *Veratrum album*, а рудеральная – у *Cerastium arvense*.

Вклады S-стратегии и C-стратегии не имеют значимых корреляций с биомассой. Доля R-стратегии связана с уменьшением биомассы ($r = -0{,}349$, $p < 0{,}001$).

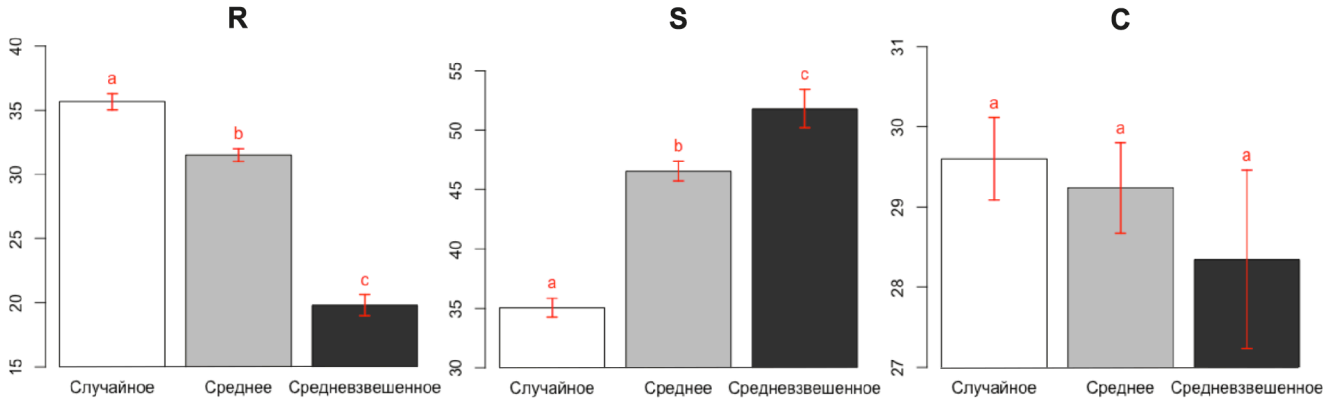


Рис. 2. Сравнение средних, средневзвешенных и случайных значений для R-стратегии, S-стратегии, C-стратегии, n = 100. Усы – ошибка среднего. Разными буквами обозначены значимо отличающиеся варианты, одинаковые буквы говорят об отсутствии значимых отличий. При нормальном распределении сравнение проводили с помощью теста Тьюки, в других случаях использовали тест Уилкоксона с поправкой Бонферрони.

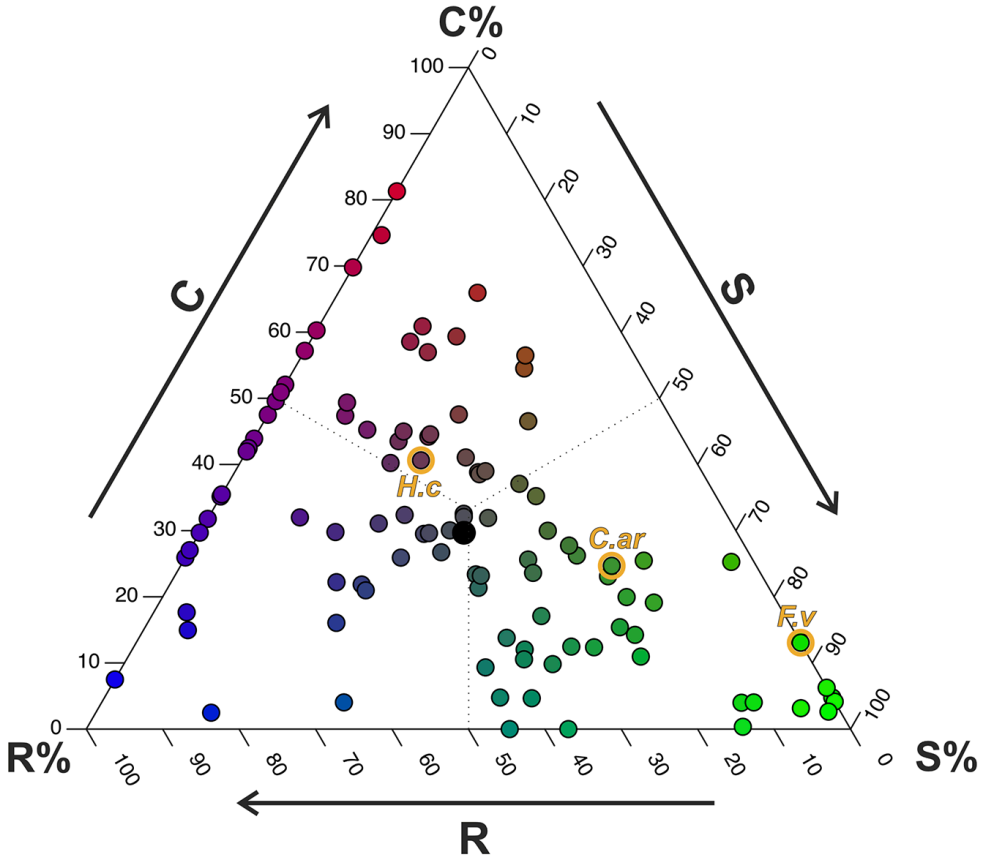


Рис. 3. Распределение видов в треугольнике CSR-стратегий. H.c – *Hedysarum caucasicum,* C.ar – *Calamagrostis arundinacea*, F.v – *Festuca varia*.

Обсуждение

Биомасса сосудистых растений в альпийских сообществах Тебердинского национального парка – в частности, на гераниево-копеечниковых лугах (318 г/м²) – сравнима с биомассой на субальпийских [14]. В этом альпийском сообществе, как и на субальпийских вейниковых лугах, один из доминантов – *Hedysarum caucasicum*, в другом же (пестроовсяницевые луга) – *Festuca varia* [14]. В сообществе субальпийского высокотравья надземная биомасса превышает биомассу нашего сообщества более чем в 2 раза. Однако ВПЛ там было меньше (280 ± 18 г/м²), что связано с высокой скоростью разложения мортмассы в этом сообществе [17]. Субальпийские болота имели меньшую биомассу (264 ± 12 г/м²), фитомассу (631 ± 32 г/м²) и ВПЛ (168 ± 11 г/м²), но гораздо бóльшую массу мхов (199 ± 33 г/м²). Доминантами болот среди функциональных групп были осоки и ситниковые (41%), также 37% составляли виды разнотравья [16]. Фитомасса наших субальпийских лугов превышает фитомассу субальпийских лугов Азербайджана – 350 г/м² [17] и субальпийских лугов Западных Альп (130–320 г/м²) [18].

Для компонентов сообщества (на основании сравнения случайных и средних значений) было важно меньшее значение массы водонасыщенного листа и удельной листовой поверхности, и большее значение массы сухого листа и доли сухого вещества. Сравнение средних и средневзвешенных значений признаков в сообществе субальпийских лугов показало, что для доминирования в сообществе важна бóльшая масса листа (как сухая, так и влажная), а также бóльшая доля сухого вещества в листе и меньшая УЛП.

Средняя площадь листа (19,8 ± 3,5 см²) и УЛП (223,2 ± 9,0 см²/г) в субальпийских сообществах оказались больше, чем в альпийских сообществах Кавказа (7,6 см² и 187 см²/г) [12] и больше, чем на высокогорных пастбищах восточной части Цинхай-Тибетского нагорья (2,4 см² и 192 см²/г) [19]. УЛП сравнима со значениями для альпийских сообществ Тебердинского национального парка [19, 20]. УЛП в сообществах Альп зависит от высоты: на высоте 600 м над уровнем моря она составляла 230 см²/г, а на высоте 3000 м – 190 см²/г, что сравнимо с нашим сообществом [21]. В исследовании Росбаха и др. [22], изменение УЛП между сообществами связывают с температурой, влияющей на участие видов в сообществах, что приводит к изменению среднего значения признака. Размер листа является хорошим признаком для изучения изменчивости экологических стратегий растений на крупномасштабных градиентах, а также может прогнозировать реакцию видов на изменение климата [23]. Мелколистные виды характерны для высоких широт и высокогорий, и это обусловлено перепадами температур между днем и ночью [24].

Преобладающей стратегией для растений субальпийских лугов является стресс-толерантная стратегия, в то время как в сообществе субальпийского высокотравья доминирует конкурентная стратегия [25]. Доминирующая стресс-толерантная стратегия и большой вклад злаков хорошо согласуются с тем, что злаки часто обладают S/CSR-стратегией [8]. Стресс-толерантная стратегия также характерна для горных сообществ, так как в них большое влияние на растительность оказывают факторы стресса, ограничивающие фотосинтетическую продукцию: низкие температуры, недостаток элементов минерального питания и др. [6]. В сообществах альпийского пояса Кавказа – в частности, пестроовсяницевых лугов – растения также демонстрировали выраженность стресс-толерантной стратегии, а выраженность конкурентной стратегии у них была меньше [9]. Рудеральность наших сообществ ниже, чем других – например, горных лугов Тибета и Кордильер [8]. В альпийских сообществах Тибета стресс-толеранты преобладали при низкой интенсивности выпаса, а при увеличении выпаса доминировали конкуренты [26]. В высокогорьях Южных Альп доминировали стресс-толе-ранты [27], то же самое было отмечено для Французских Альп [28].

Заключение

Биомасса субальпийских лугов составила 384 ± 21 г/м², что оказалось меньше, чем в субальпийском высокотравье, но больше, чем на болотах, и была сравнима с альпийскими гераниево-копеечниковыми лугами Тебердинского национального парка. Фитомасса составила 777 ± 50 г/м². В составе сообщества преобладали злаки, их доля составляла 57,1 ± 2,9%. К доминантам отнесены три вида: *Calamagrostis arundinacea* (26,5%), *Festuca varia* (23,3%) и *Hedysarum caucasicum* (8%). Компоненты сообщества, по сравнению с доминантами, имели меньшее значение массы водонасыщенного листа, меньшую долю сухой массы и большее значение УЛП (по результатам сравнения средних и средневзвешенных значений). Для доминирования в сообществе важна большая сухая масса листа, меньшее содержание воды в листе (т.е. большая доля сухого вещества), меньшая УЛП. Стресс-толерантная стратегия была преобладающей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00038п). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garnier E., Navas M.L., Grigulis K. *Plant functional diversity*. Oxford: Oxford Univ. Press; 2016. 249 pp.

2. Lachaise T., Bergmann J., Rilling M.C., van Kleunen M. Below- and aboveground traits explain local abundance, and regional, continental and global occurrence frequencies of grassland plants. *Oikos*. 2021;130(1):110–120.

3. Sporbert M., Welk E., Seidler G., et al. Different sets of traits explain abundance and distribution patterns of European plants at different spatial scales. *J. Veg. Sci*. 2021;32(2):e13016.

4. Егоров А.В., Онипченко В.Г. Структура видового разнообразия высокогорных растительных сообществ Тебердинского заповедника. *Бюл. МОИП. Отд. биол*. 2011;116(4):65–75.

5. Arnillas C.A., Borer E.T., Seabloom E.W., et al. Opposing community assembly patterns for dominant and nondominant plant species in herbaceous ecosystems globally. *Ecol. Evol*. 2021;11(24):17744–17761.

6. Grime J. P. *Plant strategies and vegetation processes*. Chichester; N.Y; Brisbane; Toronto: J. Wiley and Sons; 1979. 222 pp.

7. Grime J.P. *Plant Strategies, Vegetation Processes, and Ecosystem Properties. 2nd ed*. Chichester: John Wiley and Sons; 2001. 417 pp.

8. Pierce S., Negreiros D., Cerabolini B., et al. A global method for calculating plant CSR ecological strategies applied across biomes world-wide. *J. Funct. Ecol*. 2017;31(2):444–457.

9. Онипченко В.Г., Казанцева Е.С., Елумеева Т.Г., Захарова Е.А., Петрова С.Е., Ахметжанова А.А., Царегородцева А.А., Текеев Д.К. Абиотические факторы сильнее влияют на функциональные признаки, чем биотические: эксперименты с пересадками в высокогорьях. *Ж. общ. биол*. 2020;81(5):352–261.

10. Гулисашвили В.З. *Природные зоны и естественно-исторические области Кавказа*. М.: Наука; 1964. 327 с.

11. Onipchenko V.G., Pavlov V.N. Local plant species richness depends on the total area of alpine communities. *Dokl. Biol. Sci*. 2009;427(1):381–383.

12. Онипченко В.Г., Дудова К.В., Гулов Д.М., Ахметжанова А.А., Текеев Д.К., Елумеева Т.Г. Функциональные признаки листьев растений важны для формирования состава альпийских растительных сообществ. *Ж. общ. биол*. 2022;83(2):127–137.

13. Работнов Т.А. *Луговедение*. М.: Изд-во МГУ; 1974. 384 с.

14. Onipchenko V.G. *Alpine Ecosystems in the Northwest Caucasus*. Dordrecht; Boston; London: Kluwer Academic Publishers; 2004. 421 pp.

15. Гулов Д.М., Онипченко В.Г., Мартыненко В.Б., Федоров Н.И., Логвиненко О.А., Узденов У.Б., Хубиева О.П. Состав надземной фитомассы субальпийского высокотравья в Тебердинском национальном парке. *Бюл. МОИП. Отд. биол*. 2022;127(5):46–53.

16. Гулов Д.М., Федоров Н.И., Логвиненко О.А., Онипченко В.Г. Состав надземной фитомассы субальпийских болот в Тебердинском национальном парке. *Бюл. МОИП. Отд. биол*. 2023;128(4):27–37.

17. Вагабов З.В. Фитомасса луговой растительности малого Кавказа (в пределах Азербайджана). *Проблемы ботаники. Флора и растительность высокогорий СССР и их хозяйственное использование. Вып. 13*. Баку; 1977:66–69.

18. Deleglise C., Loucougaray G., Alard D. Spatial patterns of species and plant traits in response to 20 years of grazing exclusion in subalpine grassland communities. *J. Veg. Sci*. 2011;22(3):402–413.

19. Шидаков И.И., Онипченко В.Г. Сравнение параметров листового аппарата растений альпийского пояса Тебердинского заповедника. *Бюл. МОИП. Отд. биол*. 2007;112(4):42–50.

20. Elumeeva T.G., Onipchenko V.G., Wu Y. Leaf functional traits of plants of alpine pastures at the eastern Qinghai-Tibetan plateau. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull*. 2015;70(1):46–52.

21. Körner C. *Alpine plant life: Functional plant ecology of high mountain ecosystems. 2nd ed*. Berlin: Springer; 2003. 344 pp.

22. Rosbakh S., Römermann C., Poschlod P. Specific leaf area correlates with temperature: new evidence of trait variation at the population, species and community levels. *Alp. Bot*. 2015;125(2):79–86.

23. Moles A.T. Being John Harper: Using evolutionary ideas to improve understanding of global patterns in plant traits. *J. Ecol*. 2018;106(1):1–18.

24. Wright I.J., Dong N., Maire V., et al. Global climatic drivers of leaf size. *Science*. 2017;357(6354):917–921.

25. Dudova K.V., Dudov S.V., Akhmetzhanova A.A., Onipchenko V.G., Dzhatdoeva T.M., Tekeev D.K. Competitive strategy of subalpine tall-grass species of the northwest Caucasus. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull*. 2019;74(3):140–146.

26. Wang J., Zhang C., Yang H., Mou C., Mo L., Luo P. Plant community ecological strategy assembly response to yak grazing in an alpine meadow on the eastern Tibetan Plateau. *Land Degrad. Dev*. 2018;29(9):2920–2931.

27. Pierce S., Ceriani R.M., Andreis R., de, Luzzaro A., Cerabolini B. The leaf economics spectrum of Poaceae reflects variation in survival strategies. *Plant Biosyst*. 2007;141(3):337–343.

28. Boulangeat I., Lavergne S., Es J., van, Garraud L., Thuiller W. Niche breath, rarity and ecological characteristics within a regional flora spanning large environmental gradients. *J. Biogeogr*. 2012;39(1):204–214.

Поступила в редакцию 13.10.2023
После доработки 31.03.2024
Принята в печать 25.04.2024

RESEARCH ARTICLE

Leaf functional traits and strategies of plants in subalpine Calamagrostis meadows of the North-Western Caucasus

T.V. Poloshevets[1], V.G. Onipchenko[1, 2, *], E.V. Sandalova[1], T.M. Dzhatdoeva[3], T.G. Elumeeva[1]

[1]Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234 Russia;
[2]Teberdinsky National Park, lane Baduksky, 1, Teberda, Karachay-Cherkess Republic, 369210, Russia;
[3]Medical Institute of North Caucasian State Humanitarian Academy, Kosmonavtov 100, Cherkessk, Karachay-Cherkess Republic, 369015 Russia
[*]e-mail: vonipchenko@mail.ru

The analysis of plant functional traits and strategies is the main direction to study the formation mechanisms of the composition and structure of plant communities. Comparison of the mean species trait values with a random sample of a local flora allows us to determine the importance of the trait for the plant community formation. Comparison of mean and weighted mean shows the role of the trait in dominance. The aim of this work was to study the role of leaf functional traits and the contribution of Grime's CSR strategies in the formation of *Calamagrostis* subalpine meadows, which are the most widespread in the north-western Caucasus. The aboveground biomass in these communities is 384 ± 21 g/m^2 (mean and standard error of the mean), the mass of litter of previous years is 393 ± 40 g/m^2. The share of grasses in the community is 57,1 ± 2,9%, forbs – 32,9 ± 2,6%, legumes – 8,9 ± 1,4%, sedges and rushes – 1 ± 0,3%. The three species can be considered as dominants: *Calamagrostis arundinacea* (26,5% of the total phytomass), *Festuca varia* (23,3%), *Hedysarum caucasicum* (8%). The dominants of community have a high leaf dry mass, a lower leaf water content, a smaller specific leaf area. The community components are characterized by a lower mass of the water-saturated leaf and dry matter content, and a higher specific leaf area. Dominants and components in the community are characterized by a greater contribution of the stress-tolerant strategy.

Keywords: *functional traits, ecological strategies, subalpine meadows, Calamagrostis arundinacea, aboveground biomass, weighted mean*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 19-14-00038п.

Сведения об авторах

Полошевец Таисия Владимировна – магистрант кафедры экологии и географии растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: po.taya@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0009-0004-9493-2403

Онипченко Владимир Гертрудович – докт. биол. наук, зав. кафедрой экологии и географии растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: vonipchenko@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1626-1171

Сандалова Елизавета Владимировна – аспирант кафедры экологии и географии растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: cataphyll@list.ru

Джатдоева Тамара Магометовна – ассистент кафедры биологии Медицинского института Северо-Кавказской государственной академии. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: dzhatdoeva1975@mail.ru

Елумеева Татьяна Георгиевна – канд. биол. наук, доц. кафедры экологии и географии растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: elumeeva@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0589-830X

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 574.1+592+581+571.642

Комплексная научно-исследовательская экспедиция «Крильон 2023»: первые находки и предварительные результаты

И.И. Гордеев[1, 2, *], Ю.С. Токарев[3], Е.А. Давыдов[4], И.А. Екимова[1], К.А. Дроздов[5], И.О. Яценко[6], О.В. Яценко[6], Н.А. Кочунова[7], Н.В. Бухарова[8], М.С. Кондратьев[9], А.А. Миролюбов[10], И.О. Рожкова-Тимина[11, 12], С.С. Макеев[13], Д.Ю. Гришина[1], А.Д. Плаксин[14], А.А. Семенов[14]

[1]Кафедра зоологии беспозвоночных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

[2]Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, 105187, г. Москва, Окружной проезд, д. 19;

[3]Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608, Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, д. 3;

[4]Алтайский государственный университет, 656049, Алтайский край, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 61;

[5]Тихоокеанский институт биоорганической химии, 690041, Приморский край, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, д. 159;

[6]Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина, Российская академия наук, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 4;

[7]Амурский филиал Ботанического сада-института, Дальневосточное отделение Российской академии наук, 675004, Амурская обл., г. Благовещенск, 2-й км Игнатьевского шоссе;

[8]Федеральный научный центр Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии, Дальневосточное отделение Российской академии наук, 690022, г. Владивосток, Пр-т 100-летия Владивостока, д. 159;

[9]Институт биофизики клетки, Российская академия наук, 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 3;

[10]Зоологический институт, Российская академия наук, Лаборатория по изучению паразитических червей и протистов, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 1;

[11]Сахалинский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», 693022, г. Южно-Сахалинск, пер. Горького, д. 22;

[12]Сахалинский государственный университет, 693000, г. Южно-Сахалинск, ул. Ленина, д. 290;

[13]Сахалинский филиал Главного бассейнового управления по рыболовству и сохранению водных биологических ресурсов, 693006, Сахалинская обл., г. Южно-Сахалинск, ул. Емельянова, д. 43-а;

[14]Беломорская биологическая станция имени Н.А. Перцова, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

[*]e-mail: gordeev_ilya@bk.ru

В августе 2023 г. состоялась комплексная экспедиция «Крильон 2023», которая охватила как наземные, так и морские биотопы в юго-восточной части полуострова Крильон (о. Сахалин, Россия). Специалистами проведены полевые работы по ихтиологии, зоологии беспозвоночных, энтомологии, ботанике, лихенологии, бриологии, микологии, паразитологии, микробиологии и морской биологии. На малоизученной территории юго-восточной части полуострова собраны данные по видовому разнообразию: отмечено более 200 видов растений, 101 вид лишайников, 127 видов мхов, 117 видов базидиальных грибов. Морские прибрежные сообщества литорали и сублиторали были изучены, в том числе, при помощи водолазных методов. Отмечено 119 видов беспозвоночных и 20 видов морских водорослей. Собраны сведения о 20 видах рыб, в том числе об их зараженности гельминтами. Работы по паразитологии включали детекцию микроспоридий у всех доступных животных-хозяев, а также поиск корнеголовых раков – паразитов членистоногих. Среди найденных животных, грибов, лишайников и растений есть редкие и исчезающие виды, включенные в региональную и федеральную Красные книги, а также ранее не отмеченные для Сахалина. Полученные результаты говорят о большом по-

© Гордеев И.И., Токарев Ю.С., Давыдов Е.А., Екимова И.А., Дроздов К.А., Яценко И.О., Яценко О.В., Кочунова Н.А., Бухарова Н.В., Кондратьев М.С., Миролюбов А.А., Рожкова-Тимина И.О., Макеев С.С., Гришина Д.Ю., Плаксин А.Д., Семенов А.А., 2024

тенциале дальнейшего изучения восточной части полуострова с точки зрения биологических наук, а также о перспективности создания на этой территории биостанции для проведения многолетних исследований и разработок.

Ключевые слова: *Сахалин, биологическое разнообразие, Восточная Азия, лишайники, фауна, флора, микобиота, залив Анива, полуостров Крильон, Дальний Восток*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-1-4

Введение

В августе 2023 г. состоялась комплексная экспедиция «Крильон 2023», в работе которой приняли участие более десяти специалистов по различным биологическим специальностям, а также молодые ученые. Экспедиция охватила как наземные, так и морские биотопы в юго-восточной части полуострова Крильон (о. Сахалин, Россия).

Остров Сахалин находится между Охотским и Японским морями и имеет значительную протяженность с севера на юг, благодаря чему на нем поясами расположены несколько климатических зон, для каждой из которых характерны свои доминирующие представители флоры и, иногда, фауны. Полуостров Крильон представляет собой самую южную оконечность Сахалина и территорию, наиболее близкую к островам Японского архипелага. В силу этих обстоятельств основу растительных сообществ составляют нетипичные для средней и северной части острова виды, которые больше не встречаются либо нигде на территории России, либо на территории остальной части Сахалина [1, 2]. Территория полуострова относится к подзоне темнохвойных лесов с примесью широколиственных пород [3], а видовая насыщенность растительного и животного мира полуострова – одна из самых высоких на Сахалине [4, 5]. Особенный интерес с точки зрения сохранения биоразнообразия представляет именно восточная половина полуострова Крильон, которой в период с 1972 по 2002 г. был присвоен статус охраняемой природной территории.

В целом Восточноазиатская флористическая область является одним из известных мировых центров флористического биоразнообразия, характеризуется значительным числом не только эндемиков, но и реликтов. Результаты исследований высших растений и грибов этой территории подтверждают наличие здесь высокого разнообразия как эволюционно молодых, так и, вероятно, древних видов. На Сахалине в целом и на полуострове Крильон в частности произрастают редкие и исчезающие виды, включенные как в Красную книгу Сахалинской области [6], так и в Красную книгу России [7], которые требуют тщательного изучения и сохранения.

Сведения о биоразнообразии грибов Дальнего Востока России в большой степени остаются фрагментарными и не отражают реального богатства этих организмов. На момент проведения экспедиции прошло более 30 лет со времен последних комплексных микологических исследований о. Сахалин. Кроме того, целенаправленных исследований микобиоты в лесах полуострова Крильон ранее никто не проводил. В настоящее время для Сахалинской обл. известно 739 видов базидиальных макромицетов, из которых более 400 видов относится к агарикоидным грибам [8]. В том числе, на о. Сахалин отмечено 577 видов (данные 52 публикаций). При этом 67 видов грибов выявлены только в Сахалинской обл. и не отмечены в близлежащих регионах материковой части России, а 46 – известны только для Сахалина. Таким образом, учитывая обширную площадь и разнообразие природных условий Сахалина, изученность микобиоты данной территории явно недостаточна, а полуостров Крильон и вовсе является «белым пятном».

Лихенофлора была изучена чуть лучше. В обобщенных литературных данных [9] для флоры лишайников и лихенофильных грибов юга Дальнего Востока отмечено 943 вида. Более поздняя работа Г.П. Урбанавичюса [10] указывает для этой территории 1107 видов, из которых 206 известны в России исключительно для юга Дальнего Востока. При этом лихенологи отмечают, что юг Дальнего Востока России – это одна из территорий, данные по лихенофлоре которой наименее полные [11]. Всего для о. Сахалин известно 736 видов лишайников (данные Е.А. Давыдова, основанные на обобщении и приведении к современной синонимике 147 работ). Территория Сахалина в отношении лишайников изучена неравномерно. Одной из наименее изученных территорий является полуостров Крильон. Среди субстратных групп хуже всего изучены лишайники, обитающие на камнях. В Красную книгу Сахалинской области [6] внесено 35 видов лишайников.

На территории юго-восточной части полуострова Крильон имеется большое количество рек и ручьев, впадающих в залив Анива. Самые крупные из них (Таранай, Бачинская, Урюм, Тамбовка, Ульяновка, Кура, Колхозная, Медведевка, Найча, Рифлянка, Могучи, Анастасия и Атласовка) служат местом нереста лососевых видов рыб, таких как сима, горбуша, кета, а также сахалинский таймень, внесенный в Красную книгу Сахалинской области [6]. Реки западного побережья залива Анива по большей части короткие – 30 км и менее в длину. Только р. Таранай и р. Урюм имеют длину 57 и 51 км соответственно. Горный

характер русла большинства из них, а также расположение в зоне тайфунов, приводящих к паводковым явлениями, во многом определяют состав биологических сообществ этих рек и околоводной территории [12–16]. Условия нереста ценных промысловых рыб и заполняемость нерестилищ в реках полуострова – это важные сведения, которые в дальнейшем ложатся в основу стратегии их промыслового использования при соблюдении предосторожного подхода [17].

Залив Анива не замерзает, что делает доступным изучение его и в зимний период, однако в прибрежной части и на литорали скапливаются ледовые и снежные наносы, которые значительно осложняют любую логистику. Прибрежные сообщества юго-западной части залива Анива отличаются богатым видовым разнообразием морских рыб, беспозвоночных и водорослей, которое привлекает исследователей самых различных специальностей. К сожалению, несмотря на наличие некоторых сведений [18], прибрежная фауна Охотского моря в целом и прибрежных вод острова Сахалин в частности до сих пор остается очень слабо изученной.

В данной статье приводятся предварительные научные результаты экспедиции «Крильон 2023», объединившей в себе полевые работы по ихтиологии, зоологии беспозвоночных, энтомологии, ботанике, лихенологии, бриологии, микологии, паразитологии, микробиологии и морской биологии.

Материалы и методы

Экспедиция «Крильон 2023» проходила в период с 3 по 25 августа 2023 г. Базовый лагерь располагался в устье р. Могучи (рис. 1).

Ботаника и бриология. Изучение наземных сообществ проводилось путем маршрутных обследований. Сбор полевых материалов основывался на общепринятых методических руководствах [19] и методиках, описанных в работах по исследованию лугов [20]. Всего собрано 323 гербарных образца мхов и 29 (травянистые растения лугов) сосудистых растений. Латинские названия родов и видов сосудистых растений приводятся согласно С.К. Черепанову [3]. Матрица сходства описаний с использованием количественного индекса Брея–Кертиса [21] для кластерного анализа рассчитана в программе IBIS 7.2 [22]. Посредством кластерного анализа была проведена доминантно-детерминатная классификация луговой растительности.

Микология. Сбор образцов грибов проводился маршрутным методом. Исследованиями были охвачены пихтово-еловые леса с березой и зарослями бамбучника, а также пойменные леса, где

Рис. 1. Район работ экспедиции «Крильон 2023». Красной точкой отмечено место расположения базы экспедиции в устье р. Могучи.

преобладающими породами служат ива и ольха. Всего на изученной территории собрано 350 образцов грибов, включая 180 агарикоидных, 149 афиллофоровых, 8 гетеробазидиальных и 13 сумчатых грибов. Весь материал обрабатывали и гербаризировали в соответствии со стандартными методиками [23–25]. После предварительной сушки образцы подвергали проморозке в течение 2 нед. при температуре –60 °C с целью уничтожения насекомых-вредителей. Идентификацию видовой принадлежности грибов проводили по морфологическим признакам. Препараты рассматривали в 10%-м растворе KOH, при необходимости производили окрашивание красителем Конго красным, а для выявления амилоидности структур использовали реактив Мельцера. При идентификации грибов пользовались определителями, монографиями, публикациями по отдельным группам [26–30]. Данные о географическом распространении и особенностях экологии отдельных видов приведены на основании собственной базы литературных источников, сводки по агарикоидным базидиомицетам России [8] и международной базы данных Global Core Biodata Resource (www.globalbiodata.org). Гербарные образцы хранятся в микологическом гербарии Федерального научного центра Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН (VLA, г. Владивосток) и в коллекции высших грибов Гербария Амурского филиала Ботанического сада-института ДВО РАН (ABGI, г. Благовещенск). Данные о гербарных образцах грибов с полуострова Крильон внесены в Базу электронного гербария Ботанического сада-института ДВО РАН (http://botsad.ru/herbarium).

Также собраны пробы для сравнительного изучения грибов-микоризообразователей эндемичных и инвазивных видов крестовника *Senecio* sp. флоры Южного Сахалина.

Лихенология. Сбор лишайников как с каменистого, так и с древесного субстрата проводился в пяти локалитетах: 1) залив Анива, мыс Канабеева; 2) правый берег р. Найча в 1 км выше устья; 3) залив Анива, мыс Анастасии, близ устья р. Водопадная; 4) долина р. Могучи; 5) долина р. Рифлянка. Определение лишайников проводилось при помощи принятых в лихенологии методик [31]. Анатомия и морфология слоевищ изучалась с использованием бинокулярной лупы Olympus CZ-61 (Olympus, Япония) и микроскопа ZEISS AxioLabA1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Анатомические срезы изготавливались от руки бритвенным лезвием и изучались в воде, для рассматривания кристаллов на срезах апотециев использовался поляризованный свет, для окрашивания апикальных аппаратов сумок использовался раствор Люголя. Для экспресс-определения лишайниковых веществ был использован метод цветных реакций: 10%-ный раствор KOH, насыщенный водный раствор $Ca(ClO)_2$, раствор йода в йодистом калии (IKI) или раствор Люголя, спиртовой раствор парафенилендиамина – $C_6H_4(NH_2)_2$, концентрированная HNO_3. Также изучалась флуоресценция некоторых метаболитов в ультрафиолетовом диапазоне света. Для ряда видов изучен состав вторичных метаболитов методом тонкослойной хроматографии по стандартной методике [32, 33].

Ихтиология. Проводилась визуальная оценка подходов горбуши в нерестовые реки по общепринятой методике [34]. Также проводился лов горбуши и симы жаберной сетью на основании разрешения № 6520230317192, выданного Федеральным агентством по рыболовству для осуществления рыболовства в научно-исследовательских и контрольных целях. Осмотр рек проводился пешим ходом в сопровождении егеря или охотоведа. Лов рыбы в ручьях, впадающих в р. Могучи и р. Найча, а также в р. Рифлянка, проводился при помощи ручного сачка (30 × 40 см). Биологический анализ улова проводился по стандартной методике [35]. Сбор образцов для гематологического анализа также проводился по стандартной методике [36, 37].

Паразитология. Паразитологическое вскрытие рыб и фиксация образцов гельминтов проводились по стандартной методике [38, 39]. Все доступные биотопы были обследованы на предмет наличия животных, которые потенциально могут быть пораженны микроспоридиями. Для этой цели было проведено вскрытие и микроскопирование нескольких десятков образцов свободноживущих морских (Anomura, Isopoda) и пресноводных (Amphipoda, Decapoda), а также паразитических (Caligidae) ракообразных; личинок водных насекомых (Odonata, Plecoptera, Trichoptera); проходных (Salmonidae) и пресноводных рыб (Gasterosteidae), а также их паразитов – цестод (Caryophyllidae) и ракообразных (Caligidae). Были проведены сборы десятиногих ракообразных в Охотском море близ устья р. Могучи для поиска особей, зараженных корнеголовыми раками (Cirripedia: Rhizocephala). В частности, в качестве потенциальных объектов исследования были выбраны раки-отшельники (Anomura) и крабы (Brachyura). Сбор раков-отшельников и крабов осуществлялся в прибрежной зоне на глубине от 0 до 1,5 м, а также с помощью водолазного оборудования на глубинах 10–20 м в трех точках: мыс Конабеевка, Тюлений остров (скалы Хирано) и близ эстуария р. Рифлянка. Из всех собранных десятиногих ракообразных были отобраны зараженные особи. Помимо этого, были зафиксированы пробы для сравнения содержания низкомолекулярных метаболитов у здоровых и зараженных особей. Для этого раки-отшельники были целиком зафиксированы и заморожены.

Морская биология. Сбор образцов на литорали проводился вручную с глубины 0,1–0,6 м и с лито-

ральных выбросов (талломы бурых и зеленых водорослей). Также было проведено изучение подводных прибрежных сообществ путем снорке-линга, сбор материала осуществлялся с глубин 0,1–1 м. Собранные экземпляры были предварительно определены, сфотографированы, снабжены этикеткой и зафиксированы в этиловом спирте для проведения морфологических и молекулярных исследований. Кроме того, было выполнено предварительное картирование донных биотопов в окрестностях устья р. Могучи на глубине до 22 м при помощи водолазных методов исследования [40]. Наблюдения за морскими млекопитающими проводили визуально.

Энтомология и пресноводные беспозвоночные. Сбор насекомых проводился общепринятыми методами [41] вручную, кошением энтомологическим сачком, а также при помощи спиртовой светоловушки с ультрафиолетовой лампой мощностью 20 В (Aspectek Ultraviolet Tube 20W; Aspectek, Canada). Сборы пресноводных беспозвоночных, включая личинок амфибиотических насекомых, производились по методам, описанным в монографии Т.С. Вшивковой с соавт. [42]. Насекомые, предназначенные в том числе для изучения зараженностью микроспоридиями, были убиты замораживанием и засушены для дальнейшего анализа.

Микробиология и биофизика. Были взяты микробиологические пробы/пробы секретов различных позвоночных и беспозвоночных животных, растений, почвы; собраны для химического и микробиологического анализа образцы объектов и жидкостей (вода из источников, луж, моря), пробы пластика из залива Анива. Отбор микробиологических проб проводился по стандартной методике с соблюдением стерильности отбираемых образцов.

Результаты и обсуждение

Ботаника и бриология. В результате работ были собраны данные о встречаемости более 200 видов сосудистых растений, среди которых было обнаружено 8 видов, включенных в Красную книгу

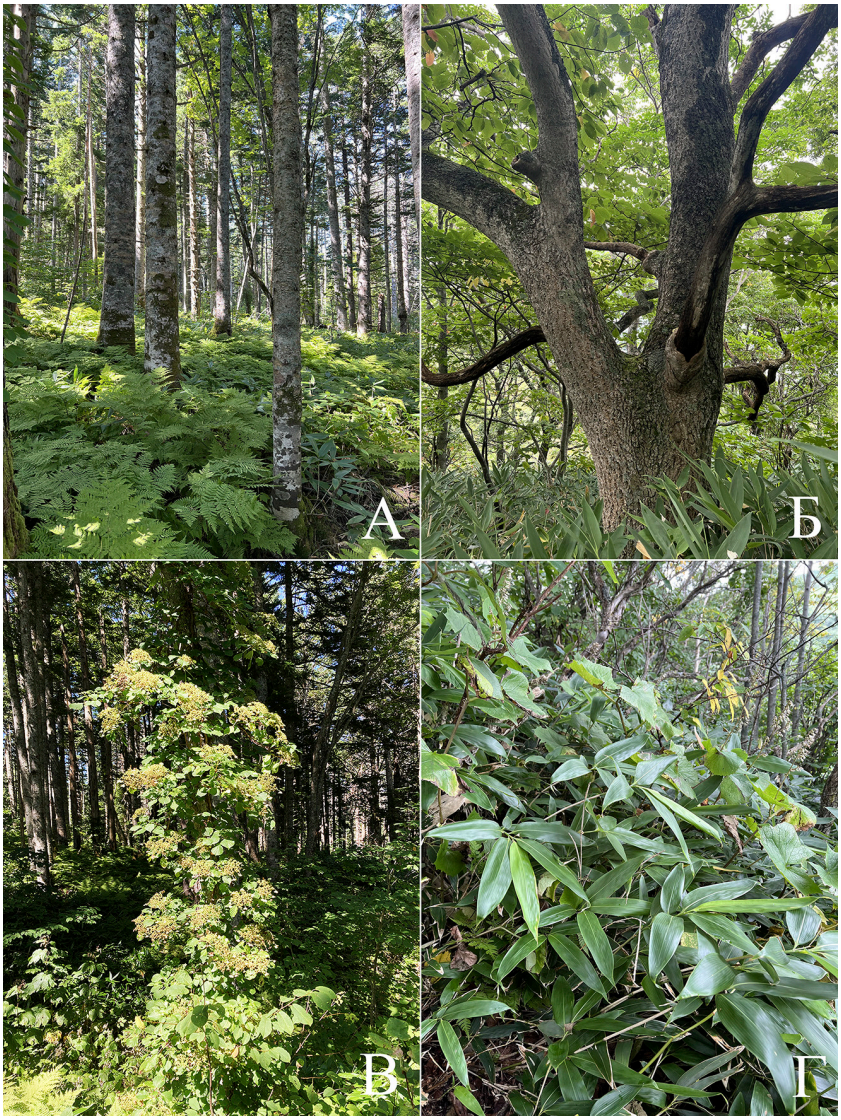


Рис. 2. Доминирующие компоненты растительности юго-восточной части полуострова Крильон. **А** – *Abies sachalinensis*; **Б** – *Phellodendron sachalinense*; **В** – *Hydrangea petiolaris*; **Г** – *Sasa* sp.

Российской Федерации, и 15 видов – в Красную книгу Сахалинской области [6]. Кроме того, отобрано более 30 образцов семян, плодов и черенков растений с целью интродукции в ботанические сады. Найдены новые и ранее не отмеченные в литературе для этого региона виды: *Arisaema sadoënse* Nakai, *Cakile edentula* (Bigelow) Hook., *Cremastra variabilis* (Blume) Nakai, *Juniperus sargentii* (A. Henry) Takeda ex Koidz., *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz., *Padus ssiori* (Fr. Schmidt) C. K. Schneid и *Phacellanthus tubiflorus* Siebold et Zucc.

Основу растительных сообществ исследованной территории составляют травянистые растения (*Leymus mollis* (Trin.) Pilg., *Artemisia vulgaris* L., *Sasa kurilensis* (Rupr.) Makino & Shibata, *Senecio pseudoarnica* Less., *Leptorumohra amurensis* (Christ) Tzvel., *Equisetum hyemale* L. *Petasites amplus* Kitam., S*enecio cannabifolius* Less.), кустарники (*Duschekia maximowiczii* (Call. ex C.K. Schneid.) Pouzar, *Ilex rugosa* Fr. Schmidt, *Ribes sachalinense* (Fr. Schmidt) Nakai, *Rosa rugosa* Thunb., *Rubus sachalinensis* Lévl., *Sambucus racemosa* L.), деревья (*Abies sachalinensis* Fr. Schmidt, *Alnus hirsuta* (Spach) Fisch. ex Rupr., *Betula ermanii* Cham., *B. platyphylla* Sukacz., *Phellodendron sachalinense* (Fr. Schmidt) Sarg., *Picea jezoensis* Carr., *Salix schwerinii* E. Wolf subsp. *yezoensis* (C.K. Schned.) Worosch., *Salix udensis* Trautv. et Mey., *Sorbus commixta* Hedl.) и лианы (*Actinidia kolomikta* (Maxim.) Maxim., *Hydrangea petiolaris* Siebold et Zucc., *Vitis coignetiae* Pulliat ex Planch.) (рис. 2). К редким и охраняемым видам относятся *Aralia cordata* Thunb., *Aralia elata* (Miq.) Seem., *Cardiocrinum cordatum* (Thunb.) Makino, *Cremastra variabilis* (Blume) Nakai, *Diphylleia grayi* Fr. Schmidt, *Hydrangea petiolaris* Siebold et Zucc., *Ilex crenata* Thunb., *Juniperus sargentii* (A. Henry) Takeda ex Koidz., *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz., *Mecodium wrightii* (Bosch) Copel., *Padus ssiori* (Fr. Schmidt) C. K. Schneid., *Phacellanthus tubiflorus* Siebold et Zucc., *Phellodendron sachalinense* (Fr. Schmidt) Sarg., *Phyllitis japonica* Kom. и *Taxus cuspidata* Siebold et Zucc. ex Endl. (рис. 3).

Рис. 3. Редкие и исчезающие виды, найденные в юго-восточной части полуострова Крильон. **А** – *Juniperus sargentii*; **Б** – *Mecodium wrightii*; **В** – *Cremastra variabilis*; **Г** – *Phyllitis japonica*.

Выполнено 38 геоботанических описаний луговых сообществ. Всего на лугах было зарегистрировано 70 видов растений, относящихся к 61 роду из 24 семейств. На рис. 4 представлена гистограмма семейственно-видового спектра.

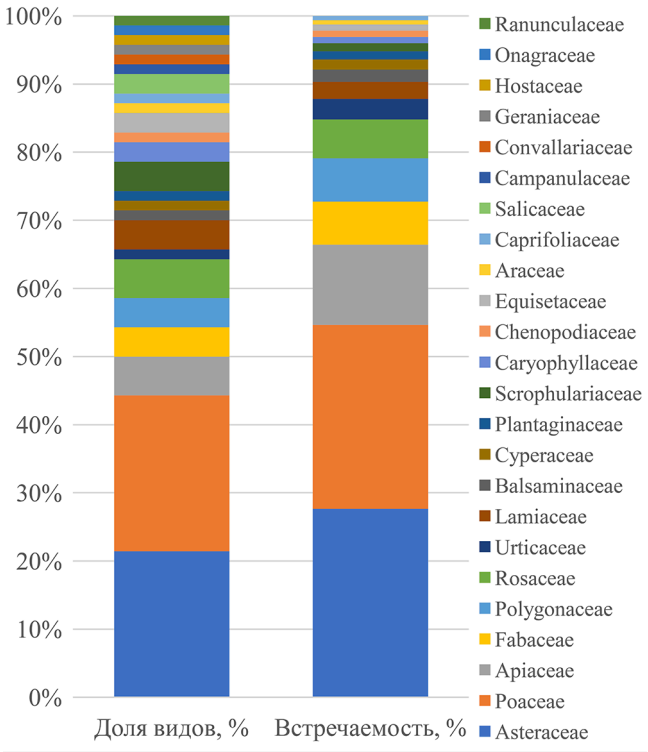


Рис. 4. Гистограмма семейственно–видового спектра растений луговых сообществ.

Выделено несколько формаций луговых сообществ полуострова Крильон в районе устья р. Могучи: 1) крупнотравные долинные сообщества, где к доминантным видам относятся *Angelica ursina* Regel., *Reynoutria sachalinensis* Nakai., *Petasites amplus*, *Filipendula camtschatica* (Pall.) Maxim., *Senecio cannabifolius, Cirsium kamtschaticum* Ledeb. ex DC. и *Cacalia robusta* Tolm.; 2) волоснецовые прибрежные сообщества морского побережья, где доминантный вид – *Leymus mollis*, реже встречаются *Lathyrus japonicus* Willd., *Artemisia vulgaris* и *Ligusticum scoticum* L.; 3) разнозлаково-разнотравные сообщества, где к доминантным видам в равной степени относятся *Rumex obtusifolius* L., *Agrimonia viscidula* Bunge., *Artemisia vulgaris, Phleum pratense* L., *Dactylis glomerata* L., *Phalaroides arundinacea* (L.) Rausch., *Poa pratensis* L. и *Senecio pseudoarnica*; 4) тростниково-бамбучниковые сообщества, где доминантные виды – *Sasa kurilensis* и *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., также встречаются *Senecio cannabifolius, Aster glehnii* Fr. Schmidt и *Artemisia vulgaris*.

В процессе работы было собрано 323 гербарных образца мхов, которые депонированы в Гербарии Главного ботанического сада РАН. Среди уже определенных видов к бриевым мхам (Bryopsida) относятся 64 вида из 30 семейств (рис. 5), а к печеночникам (Marchantiophyta) – 10 видов из 8 семейств. Среди наиболее распространенных на исследованной территории мхов можно отметить – *Trachycystis flagellaris, Callicladium haldanianum, Thamnobryum neckeroides,*

Рис. 5. Мхи юго-восточной части полуострова Крильон. **А** – *Sphagnum riparium*; **Б** – *Polytrichum piliferum*.

Myuroclada longiramea, Sciuro-hypnum reflexum и *Aquilonium adscendens*. Кроме того, был найден вид мхов, включенный в Красную Книгу Сахалинской области: *Forsstroemia japonica*.

Микология. По итогу предварительной идентификации выявлено 50 видов афиллофоровых и 67 видов агарикоидных грибов, из которых 46 видов обнаружены впервые на о. Сахалин. Из базидиомицетов, найденных на полуострове Крильон, семь видов афиллофоровых и 36 видов агарикоидных грибов отмечены впервые для Сахалинской области, а два вида являются новыми для микобиоты Дальнего Востока России.

Основная масса (89%) выявленных афиллофоровых видов грибов (рис. 6) относится к ксилотрофам, разрушающим древесину на разных стадиях разложения, в том числе 18 видов грибов, способных поражать живые деревья (*Fomitiporia punctata, Fomitopsis pinicola, Ganoderma applanatum, Inonotus obliquus, Laetiporus cremeiporus, Mensularia radiata, Phaeolus schweinitzii, Phellinus gilvus, Ph. hartigii, Ph. jezoënsis* и др.).

В биоте агарикоидных грибов (рис. 7) лучше всего представлены эколого-трофические группы микоризообразователей (часто встречаются *Amanita flavipes, A. rubescens, Boletus edulis, Russula foetens, Xerocomus subtomentosus* и др.) и ксилотрофов на мертвой древесине (*Gymnopilus junonius, Hypholoma fasciculare, Lentinellus ursinus, Pleurotus pulmonarius, Pluteus cervinus* и др.), а также группа подстилочных сапротрофов (например, *Gymnopus dryophilus, Lepiota clypeolaria, Marasmius siccus* и *Paralepista flaccida*).

Нами отмечено, что местообитания, заросшие курильским бамбучником (саза), оказались неподходящими для произрастания агарикоидных грибов. Бамбучник является лимитирующим фактором в прорастании базидиом шляпочных грибов, поскольку создает негативные условия (избыточная влажность, плохая аэрация, меньшее прогревание почвы). Наибольшим обилием базидиом отличались открытые местообитания в лесах с наименее выраженным травянистым покровом и хорошо развитой лесной подстилкой. Также

Рис. 6. Афиллофоровые грибы юго-восточной части полуострова Крильон. **А** – Стереум байковый *Stereum gausapatum*; **Б** – Пистиллярия белокопытниковая *Pistillaria petasitis*; **В** – Гименохете окровавленная *Hymenochaete cruenta*; **Г** – Трутовик лакированный *Ganoderma lucidum*.

выяснилось, что для плодоношения агарикоидных грибов в условиях изучаемой местности особенно благоприятна вторая половина августа при оптимальном сочетании влажности и температуры.

Обнаружены новые местонахождения редких видов *Ganoderma lucidum* и *Strobilomyces strobilaceus*, внесенных в Красную книгу Сахалинской области [6] и Красную книгу России [7].

В дальнейшем планируется провести идентификацию видовой принадлежности оставшихся образцов. Кроме того, 13 образцов сумчатых грибов (Ascomycota), собранных на исследованной территории, будут переданы специалистам для дальнейшего изучения.

Лихенология. В результате полевых исследований найден 101 вид лишайников, в том числе 43 эпилитных и 58 эпифитных и напочвенных видов. Основное внимание было уделено лишайникам на каменистых субстратах. Для роста и развития эпилитным лишайникам требуется длительное время, поэтому они заселяют только относительно стабильные субстраты. Несмотря на обилие гальки и валунов в приливно-отливной зоне морского побережья, лишайники здесь встречаются редко, только в специфических условиях. Возникающие новые каменистые обнажения в лесу довольно быстро зарастают высокой травянистой, а затем и древесной растительностью, делая такие местообитания непригодными для лишайников из-за практически полного отсутствия света. В условиях полуострова Крильон основные местообитания эпилитных лишайников – приморские крутые или вертикальные скалы, речные пороги, а также крупные валуны и за-

Рис. 7. Агарикоидные грибы юго-восточной части полуострова Крильон. **А** – Гимнопил Юноны *Gymnopilus junonius*; **Б** – Мухомор желтоножковый *Amanita flavipes*; **В** – Лепиота щитковая *Lepiota clypeolaria*; **Г** – Шишкогриб хлопьеножковый *Strobilomyces strobilaceus*.

растающие россыпи камней в лесу. Всего на прибрежных скалах обнаружено 43 вида лишайников. Наиболее типичные виды – *Caloplaca atroflava* (Turner) Mong., *Flavoplaca flavocitrina* (Nyl.) Arup et al., *Lecanora argentea* Oxner et Volkova, *Candelariella vitellina* (Hoffm.) Müll. Arg., *Lecidella carpathica* Körb., *Lecanora polytropa* (Hoffm.) Rabenh., *L. sulphurea* (Hoffm.) Ach., *Physcia caesia* (Hoffm.) Fürnr., *Porpidia crustulata* (Ach.) Hertel et Knoph, *Rusavskia elegans* (Link.) S. Y. Kondr. et Kärnefelt, *Scoliciosporum umbrinum* (Ach.) Arnold, виды родов *Rhizocarpon, Ramalina* и др. (рис. 8). Многие из них приведены впервые для Сахалина в течение последних лет из одного или двух местонахождений [43–46]. Местонахождения на полуострове Крильон расширяют представление об их распространении на Сахалине.

Лесные экосистемы полуострова Крильон характеризуются разнообразием видов деревьев, кора и ветви которых служат местообитаниями для эпифитных лишайников. В хвойно-широколиственных лесах наиболее часто встречаются *Anaptychia isidiza* Kurok. *Cetrelia olivetorum* (Nyl.) W.L. Culb. et C.F. Culb. *Lopadium disciforme* (Flot.) Kullh. *Menegazzia subsimilis* (H. Magn.) R. Sant., *Mikhtomia gordejevii* (Tomin) S. Y. Kondr. et al., *Parmelia fertilis* Müll. Arg., *P. squarrosa* Hale, виды родов *Hypogymnia, Lecanora, Phaeophyscia, Polyblastidium* и др. В пойменных лесах также обитают виды родов *Collema*, *Leptogium, Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, *Heterodermia speciosa* (Wulfen) Trevis., *Melanohalea olivacea* (L.) O. Blanco et al. и другие. Напочвенные виды практически отсутствуют, поскольку не выдерживают конкуренции с травянистой растительностью. Немногочисленные виды родов *Cladonia* и *Peltigera* селятся в основаниях стволов деревьев, на обработанной древесине либо на каменистых участках. Всего в лесных экосистемах обнаружено 58 видов лишайников, что далеко не исчерпывает их разнообразие. Нами выявлено шесть видов лишайников, охраняемых на федеральном или региональном уровнях. Из них четыре вида внесены в Красную книгу Сахалинской области [6] и четыре вида – в Красную книгу Российской Федерации [7]. Все виды обнаружены в долине р. Могучи, в хвойно-широколиственных и долинных лесах, один вид – *Menegazzia subsimilis* – в долине р. Найча. Все выявленные локалитеты новые и не были упомянуты в последнем издании Красной книги Сахалинской области (таблица, рис. 9).

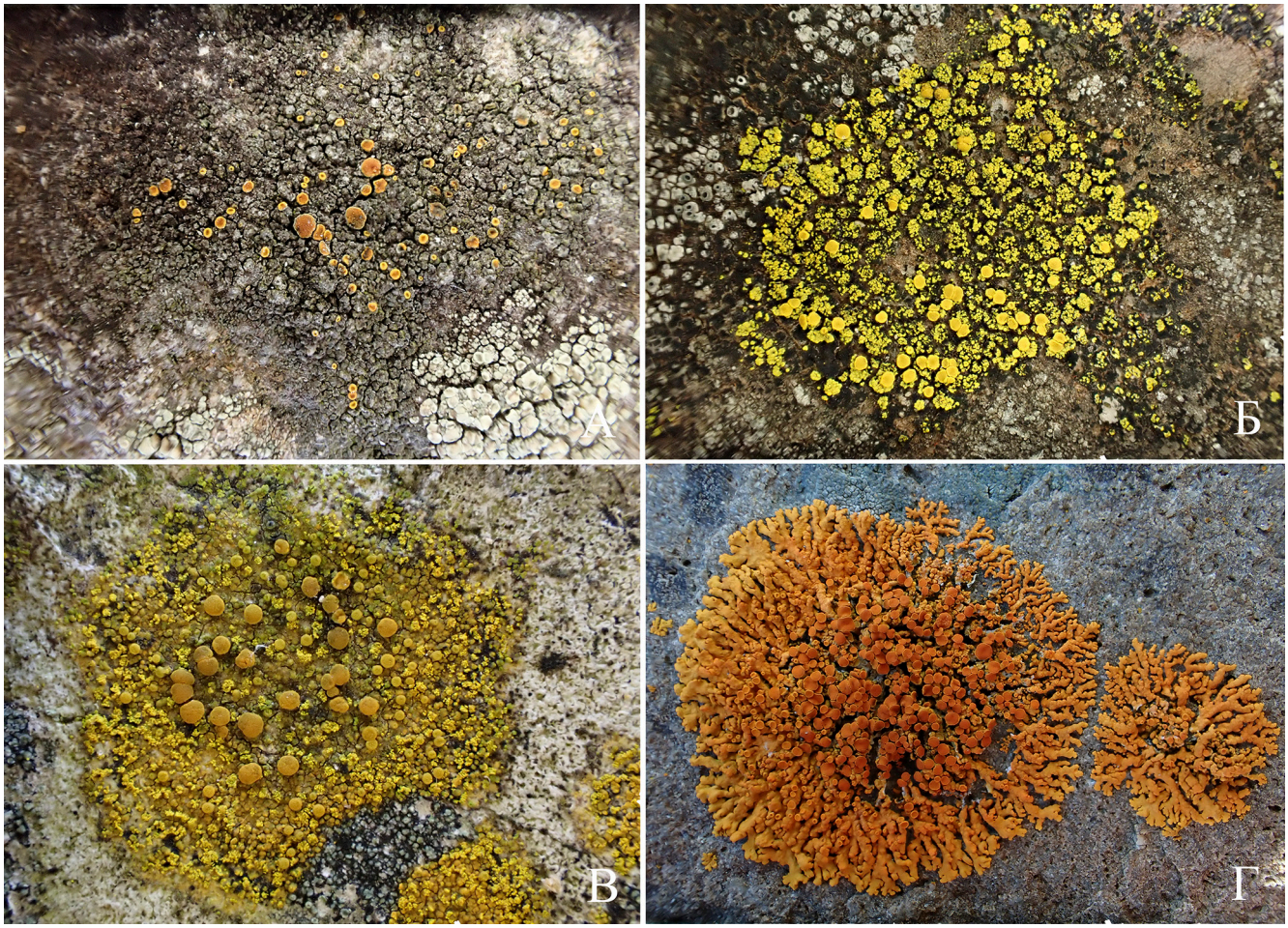


Рис. 8. Распространенные лишайники каменистых обнажений юго-восточной части полуострова Крильон. **А** – *Caloplaca atroflava*; **Б** – *Candelariella vitellina*; **В** – *Flavoplaca flavocitrina*; **Г** – *Rusavskia elegans*.

Таблица

Охраняемые лишайники юго-восточной части полуострова Крильон

№	Русское название	Латинское название	Статус в Красной книге Сахалинской обл. [8]	Статус в Красной книге РФ [9]	Местонахождения
1	Гипогимния двояковидная	*Hypogymnia duplicatoides*	2а	–	Правый берег р. Могучи близ устья
2	Гипогимния хрупкая	*Hypogymnia fragillima*	3д	3(У) III	Правый берег р. Могучи близ устья
3	Лобария легочная	*Lobaria pulmonaria*	3б	2(БУ) III	Долина р. Могучи в 3 км от устья
4	Менегацция почти подобная	*Menegazzia subsimilis*	–	3(У) III	Правый берег р. Найча в 1 км выше устья; правый берег р. Могучи близ устья, долина р. Могучи в 5 км от устья
5	Лептогиум Бурнета	*Leptogium burnetiae*	–	3(БУ) III	Долина р. Могучи в 3 км от устья
6	Уснея растрескавшаяся	*Usnea diffracta*	3 б	–	Правый берег р. Могучи близ устья

Рис. 9. Охраняемые виды лишайников юго-восточной части полуострова Крильон. **А** – *Hypogymnia duplicatoides*; **Б** – *Menegazzia subsimilis*; **В** – *Lobaria pulmonaria*; **Г** – *Hypogymnia fragillima*.

Ихтиология. В результате исследования нерестилищ малых рек западного берега залива Анива были получены результаты, характеризующие интенсивность нерестовой миграции (хода) горбуши *Oncorhynchus gorbuscha*, количество особей в реке, их плотность на нерестилищах, а также произведен пересчет заполнения нерестилищ на основании паспортной площади. Результаты оказались более чем скромными – заполнение нерестилищ производителями горбуши на большей части рек не превышало 20%. В значительной степени это связано с паводковыми явлениями, вызванными прошедшими в августе 2023 г. тайфунами – большая часть зашедших на нерест особей была смыта обратно в море. Из лососевых видов рыб, помимо горбуши, в ручьях, впадающих в р. Могучи и р. Найча, были отмечены молодь (рис. 10) и карликовые самцы симы *Oncorhynchus masou*.

Всего исследовано 48 особей горбуши. Длина по Смитту (AC) самок (14) составила 39,6–55,0 см, в среднем – 45,68 ± 0,46 см. Вес – от 885 до 2325 г, в среднем – 1280 ± 41,53 г. Самки (14) были длиной (AC) 42,1–48,3 см, в среднем – 44,5 ± 0,45 см. Вес варьировал от 1015 до 1712 г, в среднем – 1210,50 ± 46,33 г. Вес гонад варьировал от 95,3 до 189 г (среднее – 148,06 ± 8,60). Гонадо-соматический индекс (ГСИ) варьировал от 7,6 до 22,69%, в среднем составив 15,26 ± 1,05%. Гонады всех, кроме одной, самок находились на IV–V стадиях зрелости. Самцы (34) были длиной (AC) 39,6–55,0 см (среднее – 46,15 ± 6,14). Вес варьировал от 885 до 2325 г, в среднем – 1308,47 ± 55,10. Вес гонад варьировал от 56 до 126 г (среднее – 88,81 ± 3,55). ГСИ варьировал от 4,82 до 13,76% (в среднем – 7,97 ± 0,36). Гонады находились на III–IV (62%), IV (29%) и IV–V (9%) стадиях зрелости.

Длина изученных особей молоди симы (AC) варьировала от 43 до 117 мм, в среднем составив 69,01 ± 2,12 мм. Вес – от 0,8 до 16,2 г, в среднем 4,29 ± 0,36 г. Карликовый самец был длиной 350 мм и весом 62,6 г.

Генетические образцы симы и горбуши депонированы в Российской национальной коллекции эталонных генетических материалов (Центральный институт ФГБНУ «ВНИРО», г. Москва).

Также в реках и их притоках отмечены тихоокеанская минога *Lethenteron camtschaticum*, сибирский голец *Barbatula toni*, сахалинский озерный гольян *Rhynchocypris sachalinensis*, кета *Oncorhynchus keta*, южная мальма *Salvelinus curilus*, кунджа *Salvelinus leucomaenis*, сахалинский подкаменщик *Cottus amblystomopsis*, пресноводный дальневосточный бычок *Gymnogobius urotaenia*, китайская девятииглая колюшка *Pungitius sinensis*.

В прибрежных морских водах отмечены крупночешуйная красноперка-угай *Pseudaspius hakonensis*, звездчатая камбала *Platichthys stellatus*, камбала Шренка *Pseudopleuronectes schrenki*, восточная бельдюга *Zoarces elongatus*, дальневосточная песчанка *Ammodytes hexapterus*, южный одноперый терпуг *Pleurogrammus azonus*, снежный керчак *Myoxocephalus brandtii*, керчак Стеллера *M. stelleri* и др.

Сахалинский таймень *Parahucho perryi*, занесенный в Красные книги РФ [7] и Сахалинской области [6], воспроизводится во всех крупных реках полуострова (Урюм, Тамбовка, Ульяновка, Найча), но наиболее многочисленная популяция отмечена в р. Могучи.

Паразитология. В районе устья р. Могучи обнаружено три вида корнеголовых ракообразных. В биотопе скальных выходов около мыса Канабеева найдена одна особь рака-отшельника, зараженного, предположительно, паразитом вида *Peltogasterella gracilis* (экстенсивность инвазии ~0,125%). На одной из экстерн (часть тела корнеголового ракообразного, вынесенная за пределы тела хозяина и выполняющая репродуктивную функцию) обнаружена личинка самца, осевшая на кутикулу экстерны в районе мантийной поры. Данная находка представляет особую ценность, так как в природе редко удается увидеть момент прикрепления личинки самца к экстерне самки. В другом раке-отшельнике рода *Pagurus* (пока не установленной видовой принадлежности) был обнаружен паразит, предположительно относящийся к роду *Peltogaster* (экстенсивность инвазии ~ 0,125%). Мы предполагаем, что данный вид может быть описан как новый, поскольку ни хозяин, ни паразит не были ранее описаны в Охотском море.

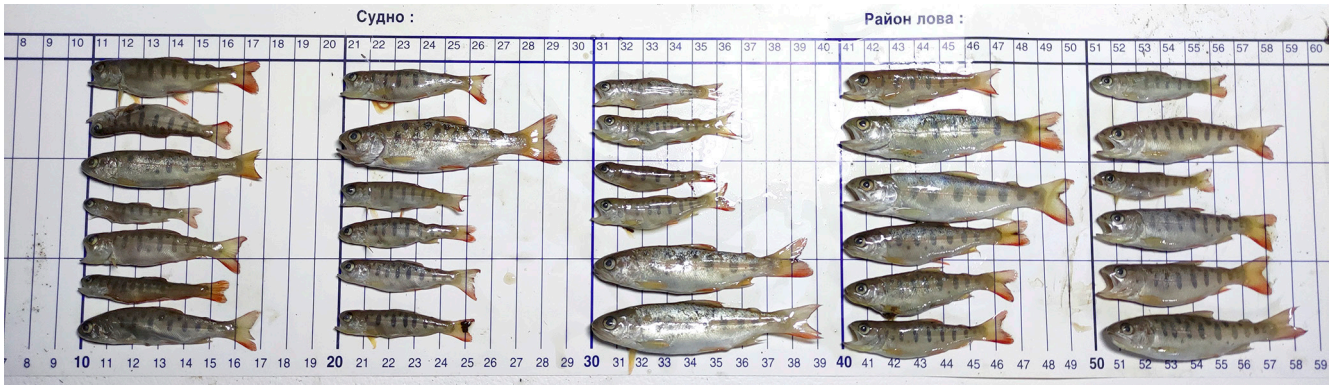


Рис. 10. Молодь симы *Oncorhynchus masou*.

В эстуарии р. Могучи удалось собрать 25 мохнаторуких крабов *Eriocheir* sp., девять из которых оказались заражены корнеголовым ракообразным *Polyascus gregarius* (экстенсивность инвазии – 36%) (рис. 11). Такая большая экстенсивность является редкой для природных популяций, что делает этот вид удобным модельным объектом для разнообразных исследований – с использованием как традиционных морфологических методов, так и молекулярных. Среди других паразитов, ассоциированных с раками-отшельниками, нами были найдены паразитические изоподы, относящиеся к семейству Bopyridae. Эти эктопаразиты часто встречаются на абдомене и в жаберной камере хозяина. Кроме того, в гемоцеле раков-отшельников встречены скопления спор микроспоридий. Крабы были заражены не только паразитическими корнеголовыми раками, но и метацеркариями трематод.

Рис. 11. Краб *Eriocheir* sp., зараженный корнеголовым *Polyascus gregarius*.

Отсутствие заражения микроспоридиями других видов того же рода раков-отшельников (*Pagurus*) наводит на мысль о том, что инфекция в данном случае передается преимущественно вертикальным путем (от родительских особей дочерним), поскольку при горизонтальном пути распространения инфекции, предполагающем обмен между особями одного поколения, вероятность заражения совместно обитающих особей разных видов должна быть примерно одинаковой. По крайней мере, близкородственные виды хозяев обычно одинаково восприимчивы к одному виду микроспоридий [47–48]. Заражение рака-отшельника проявлялось в виде сильной гипертрофии внутренних органов, хорошо различимых в виде белых пятен, просвечивающих сквозь покровы абдомена извлеченных из раковины особей (рис. 12А). В отличие от здоровых особей, у зараженных полость тела была заполнена гипертрофированной тканью (рис. 12Б). При микроскопировании на мазке наблюдалась масса спор, собранных группами по 8 (октоспоры) в так называемом спорофорном пузырьке (рис. 12В).

Исследование зараженности рыб макропаразитами показало значительную зараженность молоди симы нематодами *Salvelinema* sp. и *Salmonema* sp. Также в кишечнике симы отмечены цестоды рода *Cyathocephallus*. Паразитологическое вскрытие горбуши показало зараженность плероцеркоидами рода *Pelichnibothrium*, нематодами семейства Anisakidae и трематодами *Brachyphallus crenatus*.

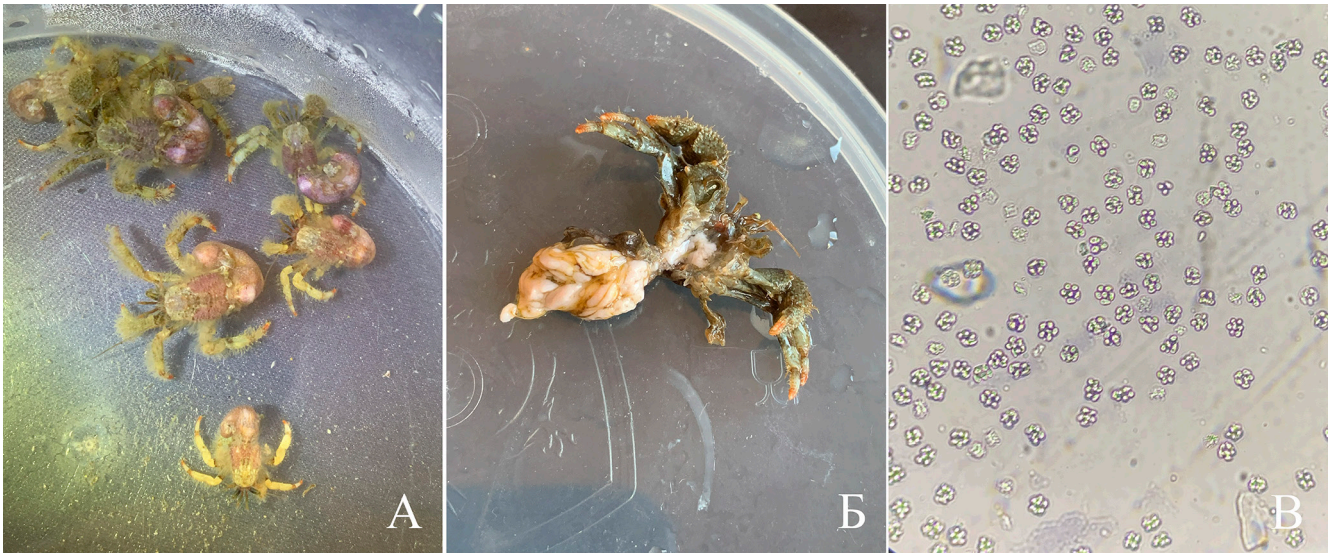


Рис. 12. Заражение рака-отшельника *Pagurus* sp. микроспоридией. **А** – внешний вид зараженных особей, извлеченных из раковины; **Б** – гипертрофированные под воздействием паразита ткани внутренних органов; **В** – споры паразита на свежем мазке зараженных тканей.

Морская биология. Полученные нами данные свидетельствуют о высоком биологическом разнообразии беспозвоночных животных и водорослей на литорали и сублиторали полуострова Крильон. Литораль представлена двумя основными биотопами: заиленными песчаными грунтами с морскими травами *Zostera* sp., а также каменистыми грунтами и скальными выходами. В литоральных ваннах произрастают различные бурые, а также коралловые и зеленые водоросли. С глубины 0,5 м начинается сообщество ламинарий. Среди морских водорослей отмечены: красные водоросли *Corallina officinalis*, *C. pilulifera, Congregatocarpus kurilensis*, *Neohypophyllum middendorffii, Neorhodomela larix, Ptilota asplenioides, Devaleraea* spp., *Constantinea subulifera*, *Besa japonica*, *Chondrus armatus* и *Mazzaella* spp., бурые водоросли *Fucus distichus, Stephanocystis crassipes* и *Alaria angusta*, зеленые водоросли *Ulva lactuca* и *Chaetomorpha* sp. Также встречается *Phyllospadix iwatensis* (отдел Magnoliophyta).

Среди низших беспозвоночных животных литорали и верхней сублиторали (глубины 0,5–1 м) встречаются губки *Halichondria* spp., актинии *Epiactis japonica* и *Anthopleura artemisia*, гидроидные полипы *Sertularella* sp., *Sertularia* sp., *Orthopyxis* cf. *matsuensis* и *Obelia longissima*, сидячие медузы *Haliclysthus borealis* (Staurozoa). Многощетинковые черви (Polychaeta) были представлены большим количеством видов, а именно *Abarenicola pacifica, Chone* cf. *ecaudata*, *Eteone* spp., *Capitella* spp., *Harmathoe imbricata, Harmathoe* sp., *Glycinde* sp., *Nereis vexillosa*, *Nereis* sp., *Naineris* spp., *Eumida* sp., *Phyllodoce* sp., Syllidae gen. spp. и другими представителями семейств Polynoidae, Spionidae, Sabellidae, Orbiniidae, Nereididae, Phyllodocidae, Maldanidae, Cirratulidae и Terebellidae. Малакофауна включала хитонов *Cryptochiton stelleri*, *Tonicella zotini, Boreochiton* sp. и *Schizoplax brandtii*, двустворчатых моллюсков *Callista brevisiphonata*, *Ciliatocardium* sp., *Crenomytilus grayanus*, *Entodesma* sp., *Leucoma* sp., *Mizuhopecten yessoensis*, *Mytilus trossulus*, *Ruditapes philippinarum*, S*iliqua alta, Crassostrea gigas* (устрица), *Spisula sachalinensis* (спизула), *Swiftopecten swiftii* (гребешок), *Turtonia minuta* и Veneridae gen. sp., брюхоногих моллюсков *Lottia borealis, L. instabilis*, *Mitrella burchardi*, *Nucella heyseana*, *Neptunea arthritica*, *Nassarius fratercuis, Buccinum percrassum*, *Ocinebrellus lumarius*, *Neptunea arthritica*, *Euspira pila*, *Lacuna* sp., литторины *Littorina squalida, L. mandshurica* и *L. .sitkiana, Onoba* s.l., *Cryptonatica janthostoma,* а также *Eubranchus alexeii*, *E. rupium* и *Cuthonella soboli* (голожаберные моллюски). Среди обнаруженных немертин можно выделить *Kulikovia manchenkoi, Tortus tokmakovae*, *Quasitetrastemma stimpsoni*, *Cephalotrix* spp., *Zygonemertes* sp. и *Oerstedia venusta*. Наибольшее разнообразие ракообразных животных приходилось на амфипод *Ampithoe* sp., *A. valida*, *Trinorchestia* sp., *Spasskogammarus spasskii*, *Spasskogammarus* sp., *Platorchestia* sp., *Monocorophium indisiosum*, *Parallorchestes* spp., *Ishyrocerus* sp., *Jassa marmorata, Protohyale triangulata,* Corophiidae gen. sp. Другие виды ракообразных представлены крабами: японский мохнаторукий краб *Eriocheir japonica*, пятиугольный волосатый краб *Telmessus cheiragonus*, пляжный краб *Hemigrapsus takanoi* и краб Веррилла *Paralomis verrilli*; раками-отшельниками *Pagurus* spp.; мизидами *Archaeomysis articulata*; равноногими раками *Cliamenella fraudatrix*, *Idothea okhotensis*, *Ianiropsis* sp., усоногими раками *Chthamalus dalli. Megabalanus rosa, Lepas anatifera*. Фауна иглокожих включала морских ежей *Strongylocentrotus intermedius*, морских звезд *Asterias amurensis, Patiria pectinifera* и офиуру *Amphiopholis pugetana*. Фотографии некоторых из перечисленных видов представлены на рис. 13 и 14.

Небольшое количество видов было отмечено впервые для Сахалина: это голожаберные моллюски *Eubranchus rupium*, *E. alexeii*, морские блюдечки *Lottia borealis* и немертина *Oerstedia venusta*. Находки амфипод *Protohyale triangulata, Platorchestia* cf. *pacifica* и *Ampithoe valida* требуют дополнительной верификации специалистами по этой группе. В то же время, хотя большинство видов, представленных в нашем материале, являются весьма обычными литоральными видами, обитающими в различных морях Дальнего Востока, были обнаружены морфологические и генетические отличия, что может свидетельствовать о наличии скрытого биоразнообразия. Наши предварительные результаты свидетельствуют о том, что необходима масштабная ревизия биологического разнообразия различных таксономических групп как на Сахалине, так и в Дальневосточных морях в целом, особенно представителей таксонов Polychaeta, Amphipoda, Hydrozoa, некоторых представителей типов Mollusca и Nemertini. Полученные от образцов молекулярно-генетические данные станут основой для будущих таксономических работ и заложат фундамент для дальнейшего изучения эволюционных отношений отдельных групп беспозвоночных животных фауны морей России и связи отдельных биот северо-западной части Тихого океана, а также последующих работ по мониторингу состояния фауны дальневосточных морей.

Морские млекопитающие – пятнистая нерпа *Phoca lagra* и кольчатая нерпа *Pusa hispida* были отмечены на скалах Хирано (около 70 особей) и близ устья р. Анастасия (250–300 особей).

Картирование морских донных биотопов показало наличие вблизи устья р. Могучи нескольких их типов: 1) илистый гравийник (каменистый, слабо проточный биотоп); 2) гравийник с битой ракушечником и меньшим количеством ила (похож на илистый гравийник, но в нем больше камней различного размера и меньше илистых участков); 3) илистый песчаник (проточный биотоп, в котором дно образовано заиленным песком); 4) скальные выходы. Для каждого биотопа характерно свое сообщество беспозвоночных животных и водорослей.

Рис. 13. Представители морских беспозвоночных животных литорали и верхней сублиторали. **А** – *Nereis vexillosa*; **Б** – *Phyllodoce* sp.; **В** – *Harmathoe* sp.; **Г** – *Naineris jacutica*; **Д** – *Cirratulus* sp.; **Е** – *Capitella* sp.; **Ж** – *Nicomache* sp.; **З** – *Abarenicola pacifica*; **И** – *Chone* cf. *ecaudata*; **К** – *Tortus tokmakovae*; **Л** – *Kulikovia manchenkoi*; **М** – *Cephalothrix* cf. *mokievskii*; **Н** – *Cephalothrix* sp.; **О** – *Zygonemertes* sp.; **П** – *Neptunea arthritica*; **Р** – *Littorina squalida*; **С** – *Nucella heyseana*; **Т** – *Mitrella buchgardtii*; **У** – *Nassarius fraternicus*; **Ф** – *Lottia instabilis*; **Х** – *Cuthonella soboli*; **Ц** – *Boreochiton* sp.; **Ч** – *Shizoplax brandtii*; **Ш** – *Ruditapes philippinarum*; **Щ** – *Mytilus trossulus*; **Э** – *Ciliatocardium* sp.

Рис. 14. Представители морских беспозвоночных животных литорали и верхней сублиторали. **А** – *Eriocheir japonica*; **Б** – *Hemigrapsus takanoi*; **В** – *Pagurus middendorffii*; **Г** – *Lepas anatifera*; **Д** – *Chthamalus dalli*; **Е** – *Megabalanus rosa*; **Ж** – *Archaeomysis articulata*; **З** – *Idothea okhotensis*; **И** – *Cliamenella fraudatrix*; **К** – *Caprella* sp. 1; **Л** – *Caprella* sp. 2; **М** – *Spasskogammarus* sp.; **Н** – *Spasskogammarus spasski*; **О** – *Platorchestia* cf. *pacifica*; **П** – *Ampithoe valida*; **Р** – *Ampithoe* sp.; **С** – *Jassa marmorata*; **Т** – *Ischyroceros* sp.; **У** – *Parallorchestes* sp.; **Ф** – *Protohyale triangulata*.

Энтомология и пресноводные беспозвоночные. Собрана коллекция наземных насекомых, представленная прямокрылыми (Acrididae), жесткокрылыми (Cerambicidae, Chrysomelidae), чешуекрылыми (Erebidae, Crambidae, Pyralidae, Lycaenidae), двукрылыми и перепончатокрылыми. При помощи светоловушки пойманы имаго ручейников *Dolophilodes nomugiensis, Eubasilissa regina, Goera japonica, Hydatophylax minor, Limnephilus orientalis* и *L. sparsus*. Эта коллекция представляет собой отправную точку для последующего исследования разнообразия насекомых Южного Сахалина, а также их симбионтов.

При обследовании травянистых растений в устье р. Могучи обнаружен очаг гусениц первого-второго возраста желтогузки *Euproctis similis* на крапиве. Видовая принадлежность установлена по внешнему виду гусениц, выращенных до третьего-четвертого возраста. Протестирована пригодность листвы разных видов травянистых и древесных растений для выкармливания гусениц в условиях искусственного содержания, как в ходе экспедиции, так и после ее окончания в лабораторных условиях (рис. 15). Насекомые охотно питались листьями ряда наиболее распространенных в России видов древесных растений. В отсутствии предпочитаемых растений гусеницы также потребляли листья некоторых травянистых растений. С другой стороны, многие массово произрастающие на Южном Сахалине растения не были повреждены гусеницами в условиях эксперимента.

В устье р. Найча отловлены имаго медведицы кайя *Arctia caja,* от которых получено потомство. Это позволило не только определить спектр растений, пригодных для лабораторного выкармливания гусениц, но и провести эксперименты по их выращиванию на искусственной питательной среде. Благодаря этим результатам открываются широкие возможности для изучения зависимости физиологии и инфекционной патологии насекомых от условий питания.

В пресноводных сообществах обследованной территории обнаружены планарии, амфиподы *Gammarus koreanus*, ручейники *Apatania* sp., *Arctopsyche palpata*, *Dicosmoecus jozankeanus, Ecclisomyia kamtshatica, Hydatophylax* sp., Limnephilidae gen. sp., *Neophylax ussuriensis*, *Rhyacophila* spp., *Oligotricha lapponica*, *Stenopsyche* aff. *marmorata,* поденки *Baetis pseudothermicus, Drunella cryptomeria, Drunella* sp., *Ecdyonurus aspersus, Epeorus pellucidus, Ephemera japonica, Iron maculatus*, *Rhitrogena lepnevae,* личинки жуков, а также двукрылых сем. Chironomidae,

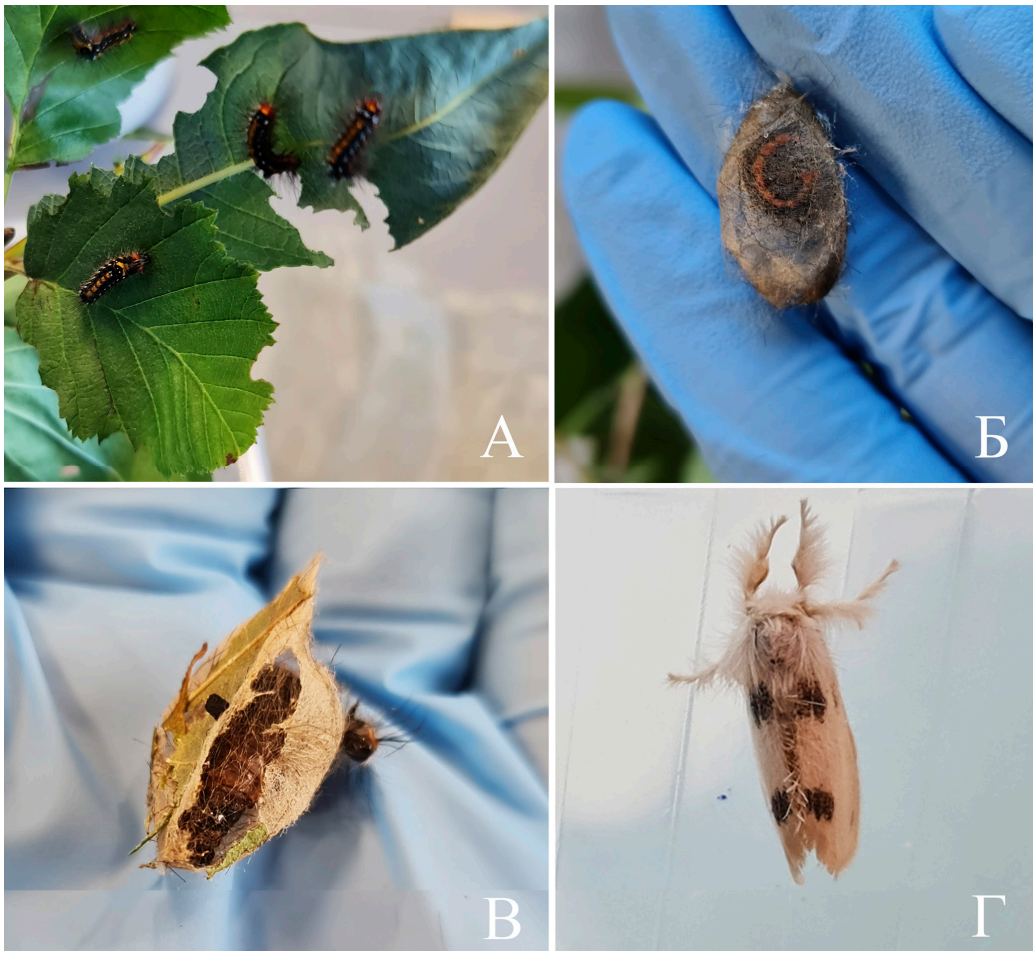


Рис. 15. Желтогузка *Euproctis similis* при выращивании в лабораторных условиях. **А** – Гусеницы. **Б** – Предкуколка. **В** – Куколка. **Г** – Бабочка. Фото Д.С. Киреевой (Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений).

Culicidae, Tipulidae и Limoniidae. Кроме того, отмечены двустворчатые моллюски *Dahurinaia laevis*.

Микробиология и биофизика. Образцы микрофлоры корневых систем тимофеевки луговой *Phleum pratense*, пырейника сибирского *Elymus sibiricus* и сазы курильской *Sasa kurilensis* будут использованы для поиска возможных симбионтов, которые помогают растениям расщеплять и усваивать внешние питательные вещества. Согласно литературным данным, слизь земноводных содержит как биологически активные макромолекулы (пептиды, токсины), так и целые сообщества бактерий и вирусов. Для их изучения были отобраны пробы слизи жабы сахалинской *Bufo sachalinensis* (рис. 16А), дальневосточной жабы *Bufo gargarizans* и дальневосточной лягушки *Rana dybowskii*. Исследование найденных образцов грибов с помощью ультрафиолетового света (370 нм), позволило выявить индуцированную флуоресценцию слизи сыроежки невзрачной *Russula nauseosa* (рис. 16Б), причиной которой могут служить живущие в слизи микроорганизмы, отобранные на анализ. Сбор и определение видовой принадлежности актиний тоже сопровождались кратковременным тестовым облучением их в лаборатории ультрафиолетом (370 нм). Один из видов, определенный как *Anthopleura artemisia*, давал флуоресценцию щупалец в зеленой области спектра видимого света.

Микробиологические пробы, отобранные из грунта, воды рек Могучи, Найча и Рифлянка, и пробы анаэробной микрофлоры будут использованы для дальнейшего изучения и выделения биомолекул, а также разработки новых антимикробных препаратов биологического происхождения.

Заключение

На малоизученной территории юго-восточной части полуострова собраны данные по видовому разнообразию: отмечено более 200 видов растений, 101 вид лишайников, 74 вида мхов, 117 видов базидиальных грибов. Были изучены, в том числе при помощи водолазных методов, морские сообщества литорали и сублиторали. Отмечено 119 видов беспозвоночных и 20 видов морских водорослей. Собраны сведения о 20 видах рыб, в том числе о зараженности гельминтами. Работы по паразитологии включали поиск микроспоридий у всех доступных животных-хозяев, а также поиск корнеголовых раков – паразитов членистоногих. Среди найденных животных, грибов и растений есть редкие и исчезающие виды, включенные в региональную и федеральную Красные книги, а также ранее не отмеченные для Сахалина. В целом Сахалин и близлежащие острова – и п-ов Крильон в частности – несут в себе большой интродукционный потенциал, как с точки зрения сохранения биоразнообразия, так и с точки зрения введения в культуру декоративных растений. Полученные результаты говорят о большом потенциале дальнейшего изучения восточной части полуострова с точки зрения биологии, а также о перспективности создания на этой территории биологической станции, которая послужит базой для проведения многолетних исследований, долгосрочных экспериментов и прикладных разработок.

Работа выполнена при финансовой поддержке Некоммерческого благотворительного фонда «Поддержка биологических исследований» (в настоящее время – НБФ «Поддержка биоисследований «БИОМ»), проекты #1 – #10/2023-гр. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Авторы выражают благодарность Л.С. Яковченко (ФНЦ Биоразнообразия наземных экосистем ДВО РАН, г. Владивосток) и А.К. Ежкину (Институт морской геологии и геофизики ДВО РАН, г. Южно-Сахалинск) за помощь в определении лишайников, А.Д. Лянгузовой (СПбГУ) за помощь в паразитологическом анализе ракообразных, а также Д.С. Киреевой (Всероссийский институт защиты растений, г. Санкт-Петербург) за проведение экспериментов по лабораторному разведению чешуекрылых насекомых и предоставленные фотографии. Исследования проводили с соблюдением международных этических норм работы с животными. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

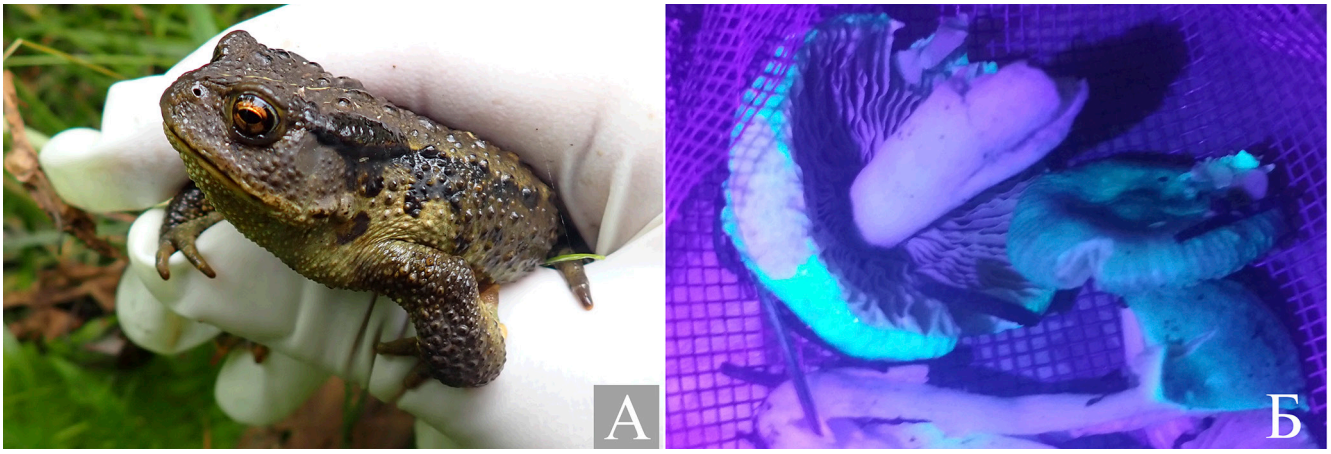


Рис. 16. А – Жаба сахалинская *Bufo sachalinensis*. **Б** – Индуцированная флуоресценция сыроежки невзрачной *Russula nauseosa*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Толмачев А.И. *Геоботаническое районирование острова Сахалина*. М.; Л.: Изд-во АН СССР; 1955. 80 с.

2. Попов М.Г. *Растительный мир Сахалина*. М.: Наука; 1969. 136 с.

3. Черепанов С.К. *Сосудистые растения России и сопредельных государств*. СПб.: Мир и семья; 1995. 990 с.

4. Хоменко З. *Справочник по физической географии Сахалинской области*. Южно-Сахалинск: Сах. кн. изд.; 2003. 112 с.

5. Богатов В.В., Питч Т.У., Стороженко С.Ю., Баркалов В.Ю., Лелей А.С., Холин С.К., Крестов П.В., Костенко В.А., Макарченко Е.А., Прозорова Л.А., Шедько С.В. Особенности формирования наземной и пресноводной биоты острова Сахалин. *Вестник ДВО РАН*. 2006;(2):32–47.

6. *Красная книга Сахалинской области: Растения и грибы*. Под ред. В.М. Еремина и А.А. Таран. Кемерово; 2019. 352 с.

7. Гарибова Л.В., Бондарцева М.А., Иванов А.И., Змитрович И.В., Коткова В.М., Коваленко А.Е., Морозова О.В., Нездойминого Э.Л., Попов Е.С., Ребриев Ю.А. *Грибы. Красная книга Российской Федерации* (*растения и грибы*). М.: Тов-во научн. изд. КМК; 2008:753–782.

8. Bolshakov S., Kalinina L., Palomozhnykh E., Potapov K., Ageyev D., Arslanov S., Filippova N., Palamarchuk M., Tomchin D., Voronina E. Agaricoid and boletoid fungi of Russia: the modern country-scale checklist of scientific names based on literature data. *Biol. Comm*. 2021;66(4):316–325.

9. Чабаненко С.И. *Конспект флоры лишайников юга российского Дальнего Востока*. Владивосток: Дальнаука; 2002. 231 с.

10. *Список лихенофлоры России*. Сост. Г.П. Урбанавичюс. СПб.: Наука; 2010. 194 с.

11. Урбанавичюс Г.П. 2011. Особенности разнообразия лихенофлоры России. *Известия РАН, сер. географическая*. 2011;1:67–78.

12. Дылдин Ю.В., Орлов А.М., Великанов А.Я., Макеев С.С., Романов В.И., Морузи И.В., Ганель Л. *Ихтиофауна залива Анива* (*остров Сахалин, Охотское море*). Новосибирск: Золотой колос; 2020. 396 с.

13. Dyldin Yu.V., Orlov A.M. Annotated list of ichthyofauna of inland and coastal waters of Sakhalin Island. 1. Families Petromyzontidae-Salmonidae. *J. Ichthyol.* 2021;61(1):48–79.

14. Dyldin Yu.V., Orlov A.M. Annotated list of ichthyofauna of inland and coastal waters of Sakhalin Island. 2. Families Osmeridae-Scombridae. *J. Ichthyol*. 2021; 61(6):519–553.

15. Dyldin Yu.V., Orlov A.M. Annotated list of ichthyofauna of inland and coastal waters of Sakhalin Island. 3. Families Priacanthidae-Sebastidae. *J. Ichthyol*. 2021;61(6):832–866.

16. Dyldin Yu.V., Orlov A.M. Annotated list of ichthyofauna of inland and coastal waters of Sakhalin Island. 4. Families Triglidae-Agonidae. *J. Ichthyol.* 2022;62(1):34–68.

17. Шевляков Е.А., Фельдман М.Г., Островский В.И., Волобуев В.В., Каев А.М., Голубь Е.В., Барабанщиков Е.И., Голованов И.С. Ориентиры и оперативная оценка пропуска производителей на нерестилища как инструменты перспективного и краткосрочного управления запасами тихоокеанских лососей в реках Дальневосточного рыбохозяйственного бассейна. *Изв. ТИНРО*. 2019;196:23–62.

18. Щукина Г.Ф., Галанин Д.А., Балконская Л.А., Шпакова Т.А., Яковлев А.А., Сергеенко В.А., Чумаков А.А. Структура и распределение прибрежных донных сообществ залива Анива. *Тр. СахНИРО*. 2003;5:3–24.

19. *Полевая геоботаника*. Т. 1–4. М.; Л.: Изд-во АН СССР; 1959–1972.

20. Шепелева Л.Ф. *Структура и динамика луговых сообществ поймы Средней Оби*. Томск: Изд-во Том. ун-та; 2019. 348 с.

21. Bray J.R., Curtis J.T. An ordination of the upland forest of the Southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 1957;27(4):325–349.

22. Zverev A.A. Methodological aspects of using indicator values in biodiversity analysis. *Contemp. Probl. Ecol.* 2020;13(4):321–332.

23. Бондарцев А.С., Зингер Р.А. Руководство по сбору высших базидиальных грибов для научного их изучения. *Тр. Бот. инст. им. В.Л. Комарова*. 1950;II(6):499–542.

24. Васильева Л.Н. *Изучение макроскопических грибов как компонентов растительных сообществ. Полевая геоботаника*. Т. 1. М.; Л.: Изд-во АН СССР; 1959:387–398.

25. Скворцов А.К. *Гербарий. Пособие по методике и технике*. М.: Наука; 1977. 199 с.

26. Бондарцева М.А. Критический обзор новейших систем семейств Polyporaceae. *Бот. журнал*. 1961;46(4):587–593.

27. Bernicchia A., Gorjón S.P. *Fungi Europaei. Vol. 12. Corticiaceae s. l.* Alassio: Edizioni Candusso; 2010. 1008 pp.

28. Dai Y.C. Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China. *Fungal Divers*. 2010;45(1):131–343.

29. *Funga Nordica: agaricoid, boletoid, clavarioid, cyphelloid and gastroid genera*. Copenhagen: Nordsvamp Publ.; 2012. 1083 pp.

30. Cui B.K., Li H.J., Ji X., Zhou J.L., Song J., Si J., Yang Z.Li., Dai Y. C. Species diversity, taxonomy and phylogeny of Polyporaceae (Basidiomycota) in China. *Fungal Divers*. 2019;97:137–392.

31. Андреев М.П., Ахти Т., Войцехович А.А., Гагарина Л.В., Герасимова Ю.В., Гимельбрант Д.Е., Давыдов Е.А., Конорева Л.А., Кузнецова Е.С., Макрый Т.В., Надеина О.В., Рандлане Т., Саар А., Соколова И.С., Степанчикова И.С., Урбанавичюс Г.П. *Флора лишайников России: Биология, экология, разнообразие, распространение и методы изучения лишайников*. М.; СПб.: Тов-во науч. изд. КМК; 2014. 392 с.

32. Culberson C.F., Kristinsson H.A. A standardized method for the identification of lichen products. *J. Chromatogr. A.* 1970;46:85–93.

33. Вайнштейн Е.А., Равинская А.П., Шапиро И.А. *Справочное пособие по хемотаксономии лишайников*. Л.: Изд-во Ботанического ин-та; 1990. 152 с.

34. *Методические рекомендации по учету численности тихоокеанских лососей в реках Сахалинской области*. Южно-Сахалинск: Изд-во СахНИРО; 2013. 30 с.

35. Правдин И.Ф. *Руководство по изучению рыб*. М.: Пищ. пром-сть; 1966. 376 с.

36. Глаголева Т.Н. *Инструкция по клиническому анализу крови молоди лососевых рыб в условиях рыбоводных хозяйств с целью оценки их физиологического состояния и дифференциальной диагностики заболеваний*. Рига: изд-во БалтНИИРХа; 1985. 48 с.

37. Иванова Н.Т. *Атлас клеток крови рыб*. М.: Легкая и пищевая промышленность; 1983. 184 с.

38. Быховская-Павловская И.Е. *Паразиты рыб. Руководство по изучению*. Л.: Наука; 1985. 124 с.

39. Klimpel S., Kuhn T., Münster J., Dörge D.D., Klapper R., Kochmann J. *Parasites of marine fish and cephalopods*. N.Y.: Springer Int. Publ.; 2019. 169 pp.

40. Блинова Е.И., Вилкова О.Ю., Милютин Д.М., Пронина О.А., Штрик В.А. 2005. Методы ландшафтных исследований и оценки запасов донных беспозвоночных и водорослей морской прибрежной зоны. *Изучение экосистем рыбохозяйственных водоемов, сбор и обработка данных о водных биологических ресурсах, техника и технология их добычи и переработки. Вып. 3*. М.: ВНИРО; 2005. 139 с.

41. Дунаев Е.А. *Методы эколого-энтомологических исследований*. М.: МосгорСЮН; 1997. 44 с.

42. Вшивкова Т.С., Иваненко Н.В., Якименко Л.В., Дроздов К.А. *Введение в биомониторинг пресных вод*. Владивосток: Владивостокский государственный университет экономики и сервиса; 2019. 214 с.

43. Konoreva L.A., Chesnokov S.V., Yakovchenko L.S., Ohmura Y., Davydov E.A. New records to the lichen biota of Russia, 1 – Sakhalin Region, with new records for the Russian Far East and the Asian part of Russia. *Botanica Pacifica*. 2020;9(2):161–173.

44. Ежкин А.К. Лишайники памятника природы «Высокогорья горы Чехова» (остров Сахалин). *Биота и среда заповедных территорий*. 2020;(4):25–38.

45. Yakovchenko L., Davydov E.A., Paukov A., Konoreva L., Chesnokov S., Ohmura Y. New records of arctic-alpine lichens from the Russian Far East. *Herzogia*. 2020;33(6):455–472.

46. Davydov E.A., Yakovchenko L.S., Galanina I., Paukov A., Frolov I., Ahti T. New records of lichens from the Russian Far East. III. Lichens of coastal habitats. *Turczaninowia*. 2021;24(1):25–36.

47. Исси И.В. Микроспоридии как тип паразитических простейших. *Протозоология*. 1986;10:6–135.

48. Tokarev Y.S., Kireeva D.S., Ignatieva A.N., Ageev A.A., Gerus A.V., Yaroslavtseva O.N., Kononchuk A.G., Malysh Y.M. Ecological vs physiological host specificity: the case of the microsporidium *Nosema pyrausta* (Paillot) Weiser, 1961. *Acta Biol Sibirica*. 2022;8:297–316.

Поступила в редакцию 05.12.2023
После доработки 08.04.2024
Принята в печать 17.04.2024

RESEARCH ARTICLE

Complex research expedition “Crillon 2023”: first findings and preliminary results

I.I. Gordeev[1, 2, *], Yu.S. Tokarev[3], E.A. Davydov[4], I.A. Ekimova[1], K.A. Drozdov[5], I.O. Yatsenko[6], O.V. Yatsenko[6], N.A. Kochunova[7], N.V. Bukharova[8], M.S. Kondratyev[9], A.A. Miroliubov[10], I.O. Rozhkova-Timina[11, 12], S.S. Makeev[13], D.Yu. Grishina[1], A.D. Plaksin[14], A.A. Semenov[14]

[1]Department of Invertebrate Zoology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

[2]Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, 19 Okruzhnoy proezd, Moscow, 105187, Russia;

[3]All-Russian Institute of Plant Protection, sh. Podbelskogo, 3, Pushkin, St. Petersburg, 196608, Russia;

[4]Altai State University, Lenin Ave., 61, Barnaul, 656049, Altai Territory, Russia;

[5]Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, pr. 100th anniversary of Vladivostok, 159, Vladivostok, 690041, Primorsky Krai;

[6]N.V. Tsitsin Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya st., 4, Moscow, 127276, Russia;

[7]Amur Branch of Botanical Garden-Institute, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 2nd km of Ignatievskoe highway, Blagoveshchensk, 675004, Amur region, Russia;

[8]Federal Scientific Center for Biodiversity of Terrestrial Biota of East Asia, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 100th Anniversary of Vladivostok Ave., 159, Vladivostok, 690022, Russia;

[9]Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, st. Institutskaya, 3, Pushchino, 142290, Moscow region, Russia;

[10]Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, Universitetskaya embankment, bld. 1, St. Petersburg, 199034, Russia;

[11]Sakhalin Research Institute of Agriculture, Gorkogo av., 22, Yuzhno-Sakhalinsk, 693022, Russia;

[12]Sakhalin State University, Lenina st., 290, Yuzhno-Sakhalinsk, 693000, Russia;

[13]Sakhalin branch of the Main Basin Authority on Fishery and Preserving Water Biological Resources, st. Emelyanova, 43-a, Yuzhno-Sakhalinsk, 693006, Sakhalin region, Russia;

[14]White Sea Biological Station, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia

[*]e-mail: gordeev_ilya@bk.ru

In August 2023, a comprehensive expedition “Crillon 2023” was performed, covering both terrestrial and marine biotopes in the southeastern part of the Crillon Peninsula (Sakhalin Island, Russia). A group of specialists carried out field work in ichthyology, invertebrate

zoology, entomology, botany, lichenology, bryology, mycology, parasitology, microbiology and marine biology. In the scarcely studied territory of the southeastern part of the peninsula, a notable amount of data on species diversity was collected, including more than 200 species of plants, 101 species of lichens, 74 species of mosses, 117 species of basidial macromycetes were recorded. Marine coastal communities of the littoral and sublittoral zones were studied, and diving methods were exploited. As many as 119 species of invertebrates and 20 species of seaweed have been recorded. Information was collected on 20 species of fish, including data on helminth infestation. Parasitological studies included the search for microsporidia in all available animal hosts, as well as the search for root crayfish – parasites of arthropods. Among the animals and plants found, there are rare and endangered species included in the regional and federal Red Books, as well as those previously not recorded for Sakhalin. The preliminary results obtained indicate great potential for further study of the eastern part of the peninsula from the standpoint of biological sciences, as well as the prospects for establishment a biological station in this area for long-term research and development.

Keywords: *Sakhalin, biological diversity, lichens, fauna, flora, Aniva Bay, Crillon Peninsula, Far East, East Asia*

Funding: The work was carried out with the financial support of the Non-profit Charitable Foundation "Support for Biological Research" (present name – "Support for Bioresearch "BIOME"), projects No. 1/2023-gr – 10/2023 gr.

Сведения об авторах

Гордеев Илья Иванович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ, ст. науч. сотр. Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии. Тел.: 8-495-939-56-95; e-mail: gordeev_ilya@bk.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6650-9120

Токарев Юрий Сергеевич – докт. биол. наук, зам. директора Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений. Тел.: 8-812-470-43-84; e-mail: ytokarev@vizr.spb.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0524-0778

Давыдов Евгений Александрович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Алтайского государственного университета. Тел.: 8-385-260-50-58 e-mail: eadavydov@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2316-8506

Екимова Ирина Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-929-56-95; e-mail: irenekimova@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1846-0780

Дроздов Константин Анатольевич – канд. биол. наук, науч. сотр. Тихоокеанского института биоорганической химии. Тел.: 8-495-335-01-00; e-mail: drovsh@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9014-5398

Яценко Игорь Олегович – канд. биол. наук, науч. сотр. Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. Тел.: 8-499-977-91-45; e-mail: i_o_yatzenko@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4378-8507

Яценко Ольга Владимировна – канд. биол. наук, науч. сотр. Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН, Тел.: 8-499-977-91-45; e-mail: olga.yatsenko.msu@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0131-2159

Кочунова Наталья Анатольевна – канд. биол. наук, науч. сотр. Амурского филиала Ботанического сада института ДВО РАН. Тел.: 8-4162-20-95-09; e-mail: taraninan@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8621-8593

Бухарова Надежда Владимировна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Федерального научного центра Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН. Тел.: 8-423-231-04-10; e-mail: nadya808080@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6530-6436

Кондратьев Максим Сергеевич – канд. физ.-мат. наук, зав. лаб. Института биофизики клетки РАН. Тел.: 8-4967-73-94-04; e-mail: ma-ko@bk.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6717-4206

Миролюбов Алексей Александрович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Зоологического института РАН. Тел.: 8-812-328-03-11; e-mail: alexmiroliubov@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3537-2341

Рожкова-Тимина Инна Олеговна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. СахНИИСХ – филиал ВИР. Тел.: 8-4242-79-63-83; e-mail: inna.timina@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8995-6062

Макеев Сергей Степанович – нач. Анивского отдела ихтиологии Сахалинский филиал ФГБУ «Главрыбвод». Тел.: 8-4242-14-14-25; e-mail: smak02@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0009-0002-1677-4062

Гришина Дарья Юрьевна – магистр кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-929-56-95; e-mail: dairiagrishina00@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4511-6125

Плаксин Антон Дмитриевич – сотр. водолазной службы Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова. Тел. 8-495-929-56-95; e-mail: anton.plaxin@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0009-0002-8034-5078

Семенов Александр Александрович – нач. водолазной службы Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова. Тел. 8-495-929-56-95; e-mail: semenov@wsbs-msu.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0067-8279

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.322.9

Теоретическое описание паккерных состояний циклических групп каротиноидов

М.М. Сурков[1], А.А. Мамчур[1], Т.Б. Станишнева-Коновалова[2], А.Б. Рубин[1], И.А. Ярошевич[1, *]

[1]Кафедра биофизики и [2]кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

[*]email: iyapromo@gmail.com

Каротиноиды являются одним из самых распространенных классов биологических пигментов. Они встречаются как в свободном виде – растворенными в гидрофобных средах, так и связанными в стехиометрические комплексы с белком – каротенопротеины. Взаимодействие между каротиноидом и белковым окружением в значительной степени зависит от молекулярной конформации и динамического поведения пигмента-кофактора. В этой работе мы, используя методы молекулярного моделирования, проанализировали весь набор альтернативных конформационных состояний боковых циклических групп каротиноидов и оценили энергетические эффекты их взаимодействия с основной сопряженной цепью. Результатом проведенного теоретического исследования является сортированный по энергии каталог альтернативных конформационных состояний для биогенных циклических каротиноидов и их оптических изомеров. Конформационные состояния, охарактеризованные в этом исследовании, могут быть использованы для корректного выбора начальных условий при решении задач молекулярного моделирования каротенопротеинов.

Ключевые слова: *каротиноиды, паккерные состояния, астаксантин, бета-каротин, кантаксантин, лютеин, зеаксантин, молекулярная динамика, квантовая химия*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-1-5

Введение

Каротиноиды – самый распространенный класс биологических пигментов. На данный момент выделено более 600 природных каротиноидов различных молекулярных структур [1]. Каротиноиды синтезируются клетками прокариот, растений и грибов путем конденсации изопреноидов с образованием фитоина, который затем претерпевает ряд перестроек и превращается в ликопин. Циклизация ликопина приводит к образованию двух альтернативных боковых β- и ε-иононовых шестичленных колец [2], которые в свою очередь могут быть модифицированы кислородсодержащими группами. Общей характеристикой каротиноидов является наличие цепи sp^2-гибридизованных атомов углерода, образующих сопряженную π-систему. Именно π-система определяет положение и форму спектральных линий этих пигментов [3–6].

Каротиноиды в природе играют разнообразные биологические роли [7]: регулируют динамику липидных мембран [8, 9], выступают в качестве антиоксидантов [10], а также выполняют целый ряд специфических биологических функций, которые реализуются в результате взаимодействия каротиноидов с белком и образования каротенопротеинов.

Спектральные и функциональные характеристики каротенопротеинов обусловлены молекулярным взаимодействием между специфическим каротиноидом-кофактором и белком. Ярким представителем этого класса пигментов является оранжевый каротиноидный белок (Orange Carotenoid Protein, OCP) – водорастворимый фоторецептор цианобактерий [11, 12]. Активируясь на интенсивном синем свету, OCP образует комплекс с фотосинтетической антенной и обеспечивает диссипацию запасенной световой энергии в тепло [13]. И активацию, и тушение обеспечивает единственная молекула каротиноида, связанная в активном центре OCP. Показано, что связывание каротиноида в активном центре приводит

© Сурков М.М., Мамчур А.А., Станишнева-Коновалова Т.Б., Рубин А.Б., Ярошевич И.А., 2024

к значительным изменениям динамического поведения каротиноида – в частности, происходит обеднение разнообразия ансамбля конформаций одного из кето-β-иононовых колец [14]. Такое изменение, приводящее к уменьшению энтропии состояния каротиноида, компенсируется увеличением энтальпии взаимодействия между каротиноидом и белком благодаря паре водородных связей между кетогруппой бокового цикла каротиноида (акцептора протонов) и остатками тирозина и триптофана (доноров протона). Трехмерная конформация боковой циклической группы называется паккерным (от англ. «pucker» – сморщенное) состоянием (англ. «puckering state», подробнее см. Материалы и Методы. Построение паккерных карт). Теоретический анализ конформационного ансамбля каротиноидов указывает на взаимное влияние паккерного состояния бокового шестичленного цикла кето-каротиноида и ансамбля водородных связей, которые, в свою очередь, определяют спектральные свойства и путь фотоактивации OCP [15–17]. Кроме того, важно указать, что экспериментальные методы определения трехмерной структуры каротенопротеинов не позволяют добиться разрешения, достаточного для однозначного определения конформации боковых циклических групп [6].

Настоящая работа посвящена систематическому исследованию молекулярных конформаций распространенных каротиноидов, связанных с трехмерной организацией их боковых циклических групп. Теоретические оценки электронных и вибронных состояний сделаны с помощью молекулярной динамики и квантово-химических расчетов на основании имеющихся структурных данных. Методы молекулярного моделирования активно применяются для исследования свойств каротиноидов [18]. Учитывая ресурсоемкость точных методов расчета электронных эффектов, моделирование крайне чувствительно к полноте сэмплинга динамического ансамбля. В свою очередь, результаты семплирования зависят от выбора начальных условий, к которым относится, в частности, выбор экспериментально не установленного конформационного состояния. Отсутствие надежных структурных данных о геометрии боковых циклических групп каротиноидов в составе каротенопротеинов зачастую приводит к произвольному выбору этой геометрии. Данная работа призвана исправить эту ситуацию и представить каталог альтернативных конформационных состояний для наиболее распространенных каротиноидов.

Материалы и методы

Каротиноиды. Для анализа были выбраны кольца пяти различных каротиноидов: астаксатин (astaxanthin, AST), бета-каротин (β-carotene, BCT), кантаксантин (canthaxanthin, CAN), лютеин (lutein, LUT) и зеаксантин (zeaxanthin, ZEA). Боковые циклические группы ZEA, AST и LUT содержат оптически активные атомы (в положении 3 для ZEA и AST, и положениях 3 и 6 для LUT), для них были проведены независимые расчеты альтернативных оптических изомеров (рис. 1).

Молекулярная динамика. Первым этапом работы было определение локальных конформаций боковых циклических групп каротиноидов. Для этого мы использовали семплирование методом молекулярной динамики. В качестве начальных условий были выбраны структуры, депонированные в базу данных ZINC [19]. Симуляции проводились с использованием пакета GROMACS 2020.1 [20] и модифицированного вручную силового поля OPLS-AA [21]. Каротиноиды размещались в вакууме. Для обеспечения семплирования всех доступных конформационных состояний боковых циклических групп была выбрана повышенная температура 400K, которая поддерживалась с помощью алгоритма Nose-Hoover [22]. Шаг интегрирования расчета составил 2 фс. Длительность симуляции составила 1,02 мкс для каждого каротиноида. Координаты для AST, BCT и CAN записывались каждые 170 шагов, для анализа использовались оба кольца. Для LUT фреймы записывались вдвое чаще, β- и ε-кольца анализировались отдельно. Суммарно для каждого типа каротиноидных колец было получено 6 млн фреймов.

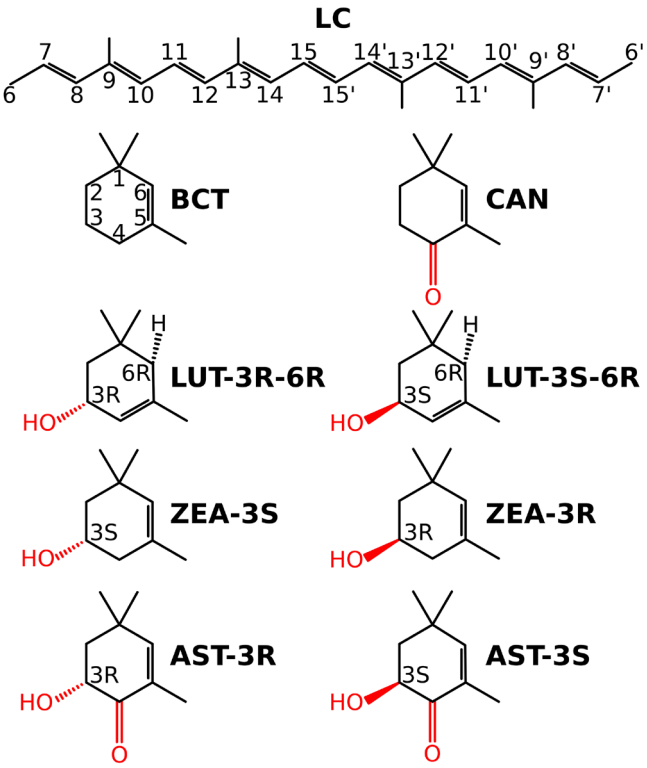


Рис. 1. Структурные мотивы исследованных каротиноидов. LC – Linear Chain – линейная sp^2-сопряженная цепь, общая для всех изученных структур; иононовые кольца каротиноидов AST (AST-3R, AST-3S), BCT (BCT), CAN (CAN), LUT (LUT-3R-6R, LUT-3S-6R) и ZEA (ZEA-3S, ZEA-3R).

Построение паккерных карт. В этой работе нами использована теория конформационной динамики шестичленных циклических групп [23]. Любой объемный шестиугольник может быть однозначно описан набором из восемнадцати координат, но для химических циклов, которые характеризуются выпуклостью и постоянством длин связей, число координат, однозначно определяющих конформационное состояние, можно уменьшить до трех. Все три полярных координаты зависят от величин смещения атомов кольца вдоль оси-нормали плоскости шестиугольника. Конформационное состояние цикла в рамках такого подхода называется паккерным (англ. «puckering state»), а редуцированное трехмерное пространство – паккерной картой (англ. «puckering map»). Две угловые координаты, φ и θ, зависят от соотношения величин и направлений этих смещений и определяют тип паккерного состояния. В свою очередь, радиальная координата Q называется полной паккерной амплитудой и равна сумме квадратов смещений атомов вдоль той же оси. В данной работе рассматриваются переходы между различными типами паккерных состояний, поэтому для анализа используются только две угловые координаты. Для определения паккерных состояний иононовых колец каротиноидов, представленных в траекториях молекулярной динамики, были построены соответствующие гистограммы в координатах φ и θ – паккерные карты. Гистограмма рассчитанных координат боковых циклических групп на паккерной сфере однозначно указывает на вероятность обнаружения кольца в каждом конкретном состоянии. Заселенность каждого конформационного состояния конвертирована в значение свободной энергии в соответствии с уравнением классической термодинамики (1):

$$G_{12}^{0} = RT \ln\left(\frac{n_1}{n_2}\right), \qquad (1)$$

где G_{12}^{0} – свободная энергия перехода из состояния 1 в состояние 2, R – универсальная газовая постоянная, T – термодинамическая температура, n_1 – заселенность состояния 1, n_2 – заселенность состояния 2.

Для визуализации полученных распределений свободной энергии использовалась синусоидальная проекция (рис. 2). Конформации шестичленного кольца и соответствующие им координаты на паккерной карте визуализированы с помощью авторского Python-алгоритма [24].

Квантовая химия. В рамках методов вычислительной квантовой химии было оценено влияние соответствующих паккерных состояний циклических групп каротиноидов на общую конформацию сопряженной π-системы. Расчеты проведены с использованием пакета ORCA [25, 26]. Для всех определенных паккерных состояний проведено сканирование потенциальной энергии вдоль координаты вращения вокруг связи C6-C7 (C6`-C7`) с шагом 10° (рис. 3). Использован метод DFT с функционалом PBE0 [27] и дисперсионной коррекцией по энергии D3 [28], базис DEF2-TZVPP [29]. Далее все конформационные состояния вблизи энергетических минимумов были подвергнуты процедуре

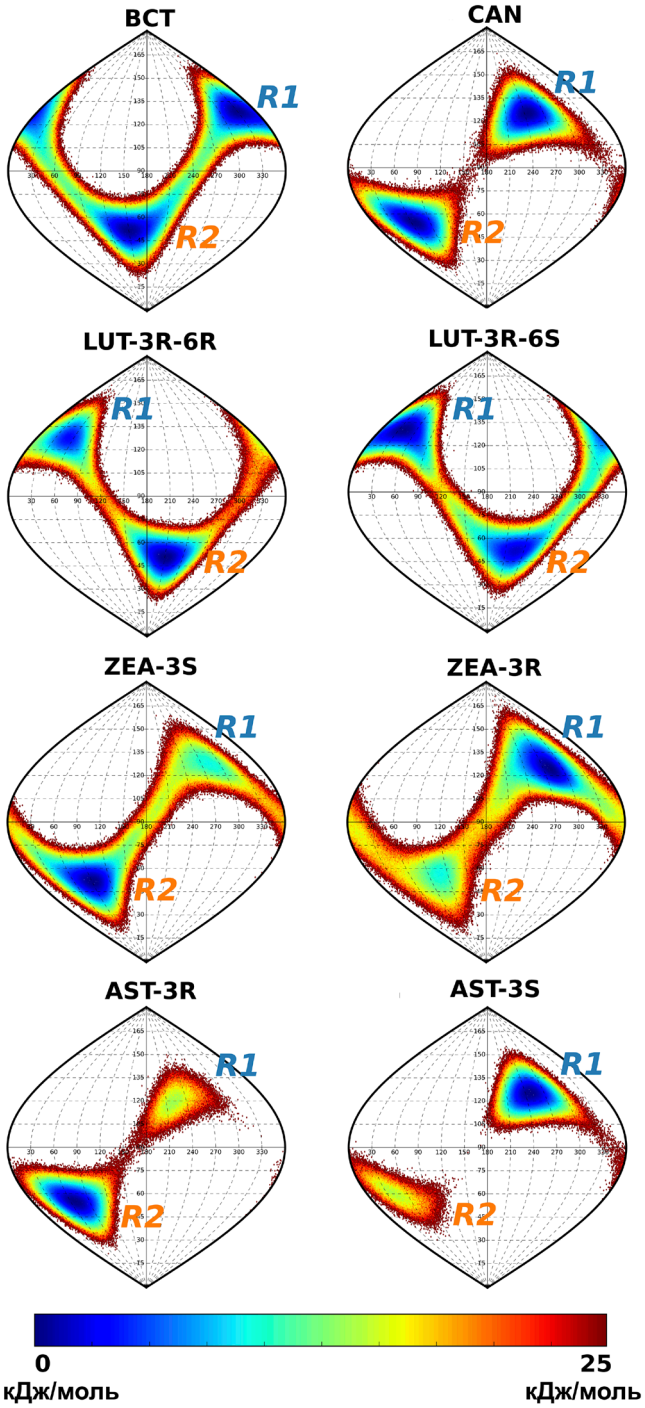


Рис. 2. Паккерные карты, вычисленные по результатам молекулярной динамики бета-каротина (BCT), кантаксантина (CAN) и оптических изомеров лютеина (LUT-3R-6S и LUT-3S-6S), зеаксантина (ZEA-3S и ZEA-3R) и астаксантина (AST-3R и AST-3S). На картах отмечены локальные конформационные паккерные состояния R1 и R2, расположенные в северном и южном полушарии паккерных карт соответственно.

глобальной оптимизации геометрии с расчетом гессиана для вычисления свободной энергии соответствующих состояний в нормальных условиях. Электронная компонента свободной энергии была уточнена в рамках функционала DLPNO-CCSD(T) [30] / DEF2-TZVPP.

Результаты и их обсуждение

На основании проведенных нами расчетов молекулярной динамики построены паккерные карты для исследованных боковых циклических групп каротиноидов (рис. 2). Для каждого исследованного кольца обнаружено два локальных паккерных минимума, соединенных двумя путями конформационного перехода. В рамках выбранной нумерации атомов (рис. 1) для каждой исследованной циклической группы одно локальное паккерное состояние находится в северном полушарии, а второе в южном полушарии паккерной карты. Мы назвали эти состояния R1 и R2 соответственно. Эти состояния энергетически вырождены для колец, не содержащих оптически активных центров (BCT и CAN). Энергетическое вырождение снимается для колец, содержащих оптически активные центры (ZEA, AST, LUT). Наличие объемного заместителя в положении C3 делает энергетически более выгодным состояние кольца, в котором конверт цикла «упаковывает» гидроксильную группу. Такая конформация, в свою очередь, зависит от последовательности расположения уникальных заместителей в хиральном центре C3. Этот эффект в случае AST усиливается образованием внутримолекулярной водородной связи между гидроксильной группой в положении C3 (донором протона) и кетогруппой в положении C4 (акцептором протона). Отдельно стоит отметить, что в соответствии с результатами молекулярной динамики энергетический барьер перехода колец, содержащих только два sp^2-гибридизационных атома углерода (BCT, ZEA и LUT), значительно ниже, чем для колец, содержащих три sp^2-гибридизационных атома (CAN, AST).

Вторым этапом этой работы было изучение влияния паккерного состояния боковой циклической группы на общую конформацию молекулы каротиноида и линейной сопряженной цепи в частности. Связь C6-C7 соединяет линейную часть сопряженной цепи и боковую циклическую группу, двугранный угол в четверке атомов C5C6C7C8 характеризует поворот боковой циклической группы относительно основной полиеновой цепи. Поворотная изомеризация этого угла ограничена стерическим эффектом отталкивания метильных заместителей в положениях C1 и C5 от заместителей линейной цепи. Кроме того, для всех исследованных каротиноидов, кроме LUT, связь C6-C7 организована двумя sp^2-гибридизованными атомами углерода и обладает соответствующими свойствами – в частности, имеет тенденцию сохранять ориентацию заместителей в плоскости. Стерические ограничения и электронное π-сопряжение формируют профиль потенциальной энергии вращения боковой циклической группы, уникальный для каждого кольца в соответствующем паккерном состоянии (рис. 3). Для BCT, CAN, LUT и ZEA профили потенциальной энергии вращения вокруг связи C6-C7 (C6`-C7`) имеют три локальных минимума, энергия перехода между которыми составляет около 15 кДж/моль. Пара низко лежащих конформационных минимумов соответствует диэдрическому углу -30° (конформация c1) и 30° (c2). Эти конформации соответствует единому цис-состоянию псевдо-одинарной связи C6-C7, которое, ввиду энергетически невыгодного сближения метильного заместителя C5 и водородного заместителя C8 в районе 0°, расщепилось надвое. Хотя энергетические различия

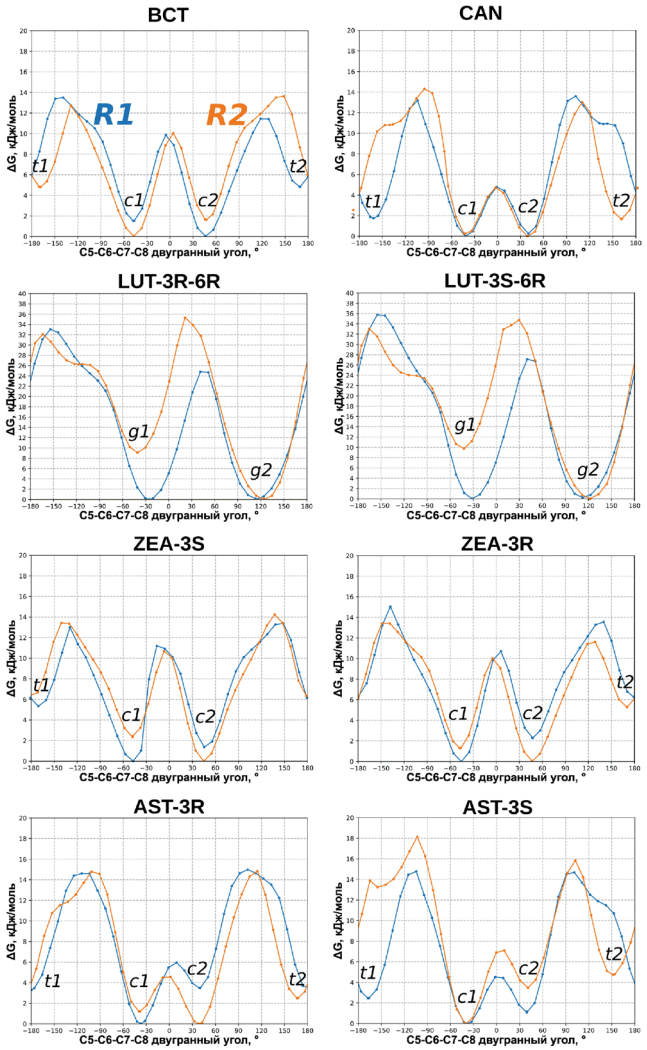


Рис. 3. Проекция поверхности потенциальной энергии на координату вращения боковых циклических групп относительно основной сопряженной цепи исследованных каротиноидов. Голубая линия соответствует паккерному состоянию R1, оранжевая – R2. На картах отмечены локальные геометрические минимумы t1, c1, c2, t2, g1, g2 двугранного угла поворота боковой цеклической группы относительно основной сопряженной цепи.

между c1 и c2 малы, можно отметить, что относительная энергия двух цис-состояний зависит от паккерного состояния кольца. В состоянии R1 глобальным минимумом выступает c2, в R2 – c1. Третий локальный конформационный минимум соответствует транс-конформации и в зависимости от паккерного состояния соответствует диэдрическому углу -160° (t1) или 160° (t2). По аналогии эта конформация обусловлена отталкиванием метильных заместителей C1 и водородного заместителя C8 в плоской конформации 180°. Так как расположение метильных заместителей C1 полностью обусловлено парой связей, входящих в кольцо (C1-C2 и C1-C6), транс-конформация боковой циклической группы значительно более чувствительна к паккерному состоянию.

LUT представляет собой особый случай. Ввиду расположения двойной связи кольца между C4 и C5 атом C6 оказывается sp^3-гибридным. С одной стороны, двойная связь кольца LUT не сопряжена с π-системой полиеновой цепи, но, с другой, она активно взаимодействует с гидроксильной группой в соседнем положении C3. Это определяет значительные отличия профиля вращения бокового цикла этой молекулы от профилей, полученных для других каротиноидов. На профиле потенциальной энергии наблюдается всего два минимума, соответствующих диэдрическим углам -30° (g1) и 120° (g2). Как и в предыдущих случаях, относительная энергия локальных геометрических минимумов зависит от паккерного состояния кольца. В состоянии R1 две конформации g1 и g2 практически вырождены по энергии, в R2 конформация g2 значительно стабилизирована, что делает ее глобальным геометрическим минимумом. Барьеры вращения вдоль координаты поворота бокового цикла LUT выше, чем для других исследованных каротиноидов, и составляют порядка 30 кДж/моль. Потенциальную энергию вдоль координаты вращения боковой группы определяют тетраэдрические углы между заместителями C6 и уже упомянутые стерические затруднения между заместителями кольца и цепи.

Последним этапом этой работы было построение энергетической иерархии среди найденных конформационных минимумов исследованных каротиноидов. Для этого каждый локальный энергетический минимум был дополнительно оптимизирован, проведен расчет нормальных колебательных мод и вычислена свободная энергия Гиббса в нормальных условиях. Результаты приведены в таблице. Полученные данные подтверждают сделанные ранее выводы. В частности, конформации c1 и c2 обладают наименьшим значением свободной энергии Гиббса. Значение свободной энергии Гиббса в минимумах поверхности потенциальной энергии зависит от паккерного состояния и не симметрично относительно перехода между состояниями R1 и R2, однако близко

Таблица

Оценка свободной энергии Гиббса в нормальных условиях локальных конформационных минимумов исследованных каротиноидов

Циклическая группа, паккерное состояние	Конформация поворотной изомеризации кольца	Относительная электронная энергия CCSD(T), кДж/моль	Относительная свободная энергия Гиббса (300K), кДж/моль
AST_3R, R1	c2	1,62	1,76
	c1	0	0
	t1	5,95	7,25
AST_3R, R2	c2	0	0
	t2	6,29	5,72
	c1	1,31	0,46
AST_3S, R1	c2	0	0,27
	c1	0,57	0
	t1	5,74	5,95
AST_3S, R2	t2	5,97	6,92
	c1	1,00	1,05
	c2	0	0
BCT, R1	c2	0	0
	t2	6,56	6,45
	c1	1,18	1,55
BCT, R2	t1	6,46	5,29
	c2	1,17	0,06
	c1	0	0
CAN, R1	c2	0,35	0,52
	t1	4,73	4,36
	c1	0	0
CAN, R2	c1	0,35	0,52
	t2	4,73	4,36
	c2	0	0
LUT_3R6R, R1	g1	0	0
	g2	0,31	0,02
LUT_3R6R, R2	g1	8,44	9,11
	g2	0	0
LUT_3S6R, R1	g1	0	0
	g2	2,39	3,94
LUT_3S6R, R2	g1	9,35	11,18
	g2	0	0
ZEA_3R, R1	c2	1,64	0,78
	t1	7,97	8,16
	c1	0	0
ZEA_3R, R2	c2	0	0
	t2	7,06	5,88
	c1	1,28	0,54
ZEA_3S, R1	c1	0	0
	t1	7,01	7,38
	c2	0,36	0,15
ZEA_3S, R2	c1	1,50	0,48
	c2	0	0
	t2	8,36	7,85

к таковому. У LUT переход из состояния R1 в состояние R2 сопровождается увеличением свободной энергии Гиббса в минимуме g1 более, чем на 9 кДж/моль. Установленные конформационные состояния каротиноидов относятся к их свободным формам и должны участвовать в процессах ассоциации-диссоциации каротиноидов с белковой глобулой.

Заключение

Наши результаты показали, что конформационная динамика каротиноидов имеет определенные закономерности. В зависимости от химического строения кольца два альтернативных паккерных состояния могут быть энергетически равнозначны либо одно из состояний может быть доминирующим в ансамбле. Паккерное состояние иононового кольца влияет на профиль потенциальной энергии вращения этого кольца относительно плоскости полиеновой цепи. Приведенные данные охватывают набор равновесных паккерных конформаций ряда наиболее распространенных каротиноидов. Наша работа позволяет уточнить структурные данные о трехмерной организации каротиноидов в составе каротенопротеинов. В первую очередь мы указываем на возможность наличия альтернативных паккерных конформаций, которые способны влиять на эффективность координации пигмента и динамику в активном центре.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-00012). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. *Carotenoids: Handbook*. Springer Science & Business Media; 2004. 708 pp.

2. Cunningham F.X., Gantt E. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene ε-cyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001;98(5):2905–2910.

3. Niedzwiedzki D., Koscielecki J.F., Cong H., Sullivan J.O., Gibson G.N., Birge R.R., Frank H.A. Ultrafast dynamics and excited state spectra of open-chain carotenoids at room and low temperatures. *J. Phys. Chem. B.* 2007;111(21):5984–5998.

4. Balevičius V., Abramavicius D., Polívka T., Galestian Pour A., Hauer J. A unified picture of s* in carotenoids. *J. Phys. Chem. Lett.* 2016;7(17):3347–3352.

5. Wei T., Balevičius V., Polívka T., Ruban A.V., Duffy C.D.P. How carotenoid distortions may determine optical properties: lessons from the Orange Carotenoid Protein. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2019;21(41):23187–23197.

6. Pishchalnikov R.Y., Yaroshevich I.A., Zlenko D.V., Tsoraev G.V., Osipov E.M., Lazarenko V.A., Parshina E.Y., Chesalin D.D., Sluchanko N.N., Maksimov E.G. The role of the local environment on the structural heterogeneity of carotenoid β-ionone rings. *Photosynth. Res.* 2023;156(1):3–17.

7. Yaroshevich I.A., Krasilnikov P.M., Rubin A.B. Functional interpretation of the role of cyclic carotenoids in photosynthetic antennas via quantum chemical calculations. *Comput. Theor. Chem.* 2015;1070:27–32.

8. Mostofian B., Johnson Q.R., Smith J.C., Cheng X. Carotenoids promote lateral packing and condensation of lipid membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020;22(21):12281–12293.

9. Gruszecki W.I., Strzałka K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Mol. Basis Dis.* 2005;1740(2):108–115.

10. El-Agamey A., Edge R., Navaratnam S., Land E.J., Truscott T.G. Carotenoid radical anions and their protonated derivatives. *Org. Lett.* 2006;8(19):4255–4258.

11. Liguori N., Xu P., Van Stokkum I.H.M., Van Oort B., Lu Y., Karcher D., Bock R., Croce R. Different carotenoid conformations have distinct functions in light-harvesting regulation in plants. *Nat. Commun.* 2017;8(1):1994.

12. Moldenhauer M., Sluchanko N.N., Buhrke D., Zlenko D.V., Tavraz N.N., Schmitt F.J., Hildebrandt P., Maksimov E.G., Friedrich T. Assembly of photoactive orange carotenoid protein from its domains unravels a carotenoid shuttle mechanism. *Photosynth. Res.* 2017;133(1–3):327–341.

13. Kirilovsky D. Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism. *Photosynth. Res.* 2007;93(1–3):7.

14. Bondanza M., Cupellini L., Faccioli P., Mennucci B. Molecular mechanisms of activation in the orange carotenoid protein revealed by molecular dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 2020;142(52):21829–21841.

15. Arcidiacono A., Accomasso D., Cupellini L., Mennucci B. How orange carotenoid protein controls the excited state dynamics of canthaxanthin. *Chem. Sci.* 2023;14(40):11158–11169.

16. Chesalin D.D., Pishchalnikov R.Y. Searching for a unique exciton model of photosynthetic pigment–protein complexes: photosystem II reaction center study by differential evolution. *Mathematics*. 2022;10(6):959.

17. Leccese S., Wilson A., Kirilovsky D., Spezia R., Jolivalt C., Mezzetti A. Light-induced infrared difference spectroscopy on three different forms of orange carotenoid protein: focus on carotenoid vibrations. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2023;22(6):1379–1391.

18. Makuch K., Markiewicz M., Pasenkiewicz-Gierula M. Asymmetric spontaneous intercalation of lutein into a phospholipid bilayer, a computational study. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2019;17:516–526.

19. Sterling T., Irwin J.J. ZINC 15 – ligand discovery for everyone. *J. Chem. Inf. Model.* 2015;55(11):2324–2337.

20. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindah E. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1–2:19–25.

21. Robertson M.J., Tirado-Rives J., Jorgensen W.L. Improved peptide and protein torsional energetics with the OPLS-AA force field. *J. Chem. Theory Comput.* 2015;11(7):3499–3509.

22. Hoover W.G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A.* 1985;31(3):1695–1697.

23. Cremer D., Pople J.A. General definition of ring puckering coordinates. *J. Am. Chem. Soc.* 1975;97(6):1354–1358.

24. MacSurmak. MacSurmak/pucker_visualizer [Электронный ресурс]. 2023. URL: https://github.com/MacSurmak/pucker_visualizer (дата обращения: 25.01.2024).

25. Neese F. Software update: the ORCA program system, version 4.0. *WIREs Comput. Mol. Sci.* 2018;8(1):e1327.

26. Neese F. Software update: The ORCA program system—Version 5.0. *WIREs Comput. Mol. Sci.* 2022;12(5):e1606.

27. Adamo C., Barone V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. *J. Chem. Phys.* 1999;110(13):6158–6170.

28. Ditchfield R., Hehre W.J., Pople J.A. Self-consistent molecular-orbital methods. IX. An extended Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. *J. Chem. Phys.* 1971;54(2):724–728.

29. Kendall R.A., Dunning T.H., Harrison R.J. Electron affinities of the first-row atoms revisited. Systematic basis sets and wave functions. *J. Chem. Phys.* 1992;96(9):6796–6806.

30. Calbo J., Sancho-García J.C., Ortí E., Aragó J. DLPNO-CCSD(T) scaled methods for the accurate treatment of large supramolecular complexes. *J. Comput. Chem.* 2017;38(21):1869–1878.

Поступила в редакцию 25.01.2024
После доработки 05.04.2024
Принята в печать 18.04.2024

RESEARCH ARTICLE

Theoretical description of pucker states of cyclic groups of carotenoids

M.M. Surkov[1], A.A. Mamchur[1], T.B. Stanishneva-Konovalova[2], A.B. Rubin[1], I.A. Yaroshevich[1, *]

[1]Department of Biophysics and [2]Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

[*]email: iyapromo@gmail.com

Carotenoids are one of the largest classes among biological pigments. They are found both in free form (dissolved in hydrophobic environments), and bound in stoichiometric complexes with protein (carotenoproteins). The interaction between the carotenoid and the protein environment is determined by the molecular conformation and dynamic behavior of the cofactor. In this work, using molecular modeling methods, we analyzed the entire set of alternative conformational states of cyclic carotenoids. The result of the theoretical study is an energy-sorted catalog of alternative conformational states for biogenic cyclic carotenoids and their optical isomers. The conformational states characterized in this study can be used to correctly select initial conditions when solving problems of molecular modeling of carotenoproteins.

Keywords: *carotenoids, pucker states, astaxanthin, beta-carotene, canthaxanthin, lutein, zeaxanthin, molecular dynamics, quantum chemistry*

Funding: The research was funded by the Russian Science Foundation, project number 22-74-00012.

Сведения об авторах

Сурков Макар Максимович – студент кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: macsurmak.m02@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0009-0001-5688-8753

Мамчур Александра Александровна – аспирант кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: al.mam4ur@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6025-7663

Станишнева-Коновалова Татьяна Борисовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-95; e-mail: stanishneva-konovalova@mail.bio.msu.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8427-8178

Рубин Андрей Борисович – академик РАН, докт. биол. наук, зав. кафедрой биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: rubin@biophys.msu.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8354-7965

Ярошевич Игорь Александрович – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: iyapromo@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8525-5568

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 574.22

Моделирование пространственного распространения европейского наземного моллюска *Cochlodina laminata* (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae) в восточной части ареала

В.В. Адамова[1, *], П.А. Украинский[2]

[1]*Кафедра биологии, институт фармации, химии и биологии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85;*

[2]*Центр валидации и верификации углеродных единиц, институт наук о Земле, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85*

[*]*e-mail: valeriavladislavna@gmail.com*

Моделирование распространения видов позволяет определить потенциальный ареал и выявить ключевые факторы, определяющие пригодность территорий для обитания. В настоящем исследовании с применением методов SDM (species distribution modelling) созданы прогнозы распространения европейского вида клаузилид *Cochlodina laminata* (Montagu, 1803) в восточной части ареала. Для создания моделей использованы различные алгоритмы, в том числе алгоритмы машинного обучения. В качестве предикторов выбраны климатические факторы и данные дистанционного зондирования Земли: расширенный вегетационный индекс и тип земельных угодий. Ансамблевый прогноз на основе всех моделей показал, что ареал *C. laminata* имеет клиновидную форму и во многом совпадает со схемой, предложенной ранее И.М. Лихаревым. Однако в восточной и юго-восточной части потенциальный ареал вида оказался шире. Установлены границы потенциального распространения *C. laminata* в зоне лесостепи и степи, а также в Причерноморье и на Кавказе. Использование данных дистанционного зондирования позволило более детально обозначить пригодные территории, что особенно важно в периферийных зонах ареала. Показано, что наиболее значимыми факторами в распределении вида на исследованной территории являются среднегодовая температура, сезонность температуры и осадки самого теплого квартала.

Ключевые слова: *экологическое моделирование, SDM, клаузилиды, регрессионные модели, машинное обучение, Восточная Европа*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-1-6

Введение

Семейство Clausiliidae во многом является уникальным среди наземных моллюсков ввиду своих экологических особенностей, большого видового разнообразия и широкого географического распространения. Моллюски этого семейства преимущественно стенобионты, и среди всех представителей европейских клаузилид «наиболее эврибионтным» видом является *Cochlodina laminata* (Montagu, 1803). Моллюск населяет лесные биотопы и обитает в лесной подстилке, гниющей древесине, пнях. Именно этот вид можно назвать наиболее широко распространенным в сравнении с другими европейскими видами семейства, но в то же время остается неясным, насколько глубоко на восток Европы и, что особенно интересно, в зону лесостепи, он заходит. В своей монографии И.М. Лихарев (1962) [1] указывал, что ареалы моллюсков сем. Clausiliidae на Восточно-Европейской равнине имеют форму клиньев, в разной степени заходящих вглубь континента. За последние десятки лет накопились сведения о распространении *C. laminata* за пределами тех границ ареала, которые указывал И.М. Лихарев. Однако, во-первых, эти сведения не обобщены, а во-вторых, безусловно, остаются «белые пятна», и границы распространения вида в восточной части его ареала, по сути, неизвестны. Так как *C. laminata* – один из немногих видов европейских клаузилид, который может населять зону лесостепи, мы поставили задачу создать модель распространения этого вида на территории Восточной Европы, включая восточные и юго-восточные границы ареала. Для решения таких задач в последние годы широко применяются методы SDM (species distribution modelling). Очевидными преимуществами этих методов являются возможность использовать разнообразные данные и предикторы, которые отражают различные факторы среды обитания, а также применение разных алгоритмов для моделирования [2, 3].

Сферы применения SDM разнообразны [3]. Так, эти методы широко применяются с целью планирования природоохранных мероприятий [4, 5]. Примером подобной работы является

© Адамова В.В., Украинский П.А., 2024

выявление территорий для сохранения большого количество видов наземных моллюсков надсемейства Orthalicoidea [6]. Другая область применения SDM – определение потенциально уязвимых для инвазий территорий [7, 8]. В этом направлении также есть примеры исследований, объектами которых являются наземные улитки и слизни [9–12].

В настоящем исследовании мы использовали SDM для моделирования потенциального распространения *C. laminata* на интересующей нас территории.

Материалы и методы

Работа включала следующие этапы:

1. Сбор данных о находках вида, их обработка.
2. Создание точек псевдоотсутствия.
3. Отбор переменных – предикторов (факторов среды).
4. Подбор математических алгоритмов моделирования, создание и кросс-валидация моделей.
5. Создание ансамблевого прогноза на основе полученных моделей.

В качестве исходных данных о местонахождении *C. laminata* были использованы полевые сборы авторов (49 пунктов); литературные данные (96 пунктов) [13–28]; данные репозитория GBIF (Global Biodiversity Information Facility, https://www.gbif.org) (4034 пункта) [29–37]; данные из коллекции лаборатории малакологии Государственного природоведческого музея НАН Украины (три пункта, www.pip-mollusca.org), данные каталогов коллекций Зоологического Института РАН и Зоологического музея МГУ (117 и 25 пунктов соответственно). Заметим, что GBIF включает в себя сведения из разнообразных источников. В том числе – данные из iNaturalist (https://www.inaturalist.org) – платформы для сбора данных не профессионалами, а добровольцами. Мы критически относимся к использованию такого источника в исследованиях распространения моллюсков, ввиду чего данные из iNaturalist были удалены из набора GBIF.

Так как невозможно избежать неравномерного распределения точек находок, было проведено пространственное разбавление с использованием пакета spThin в среде R [38]. Этот шаг подразумевает удаление некоторых точек из набора по принципу ближайшего соседа. В итоге получается набор точек, расположенных друг от друга на расстоянии, равном или большем выбранного. Для данных GBIF расстояние прореживания было равно 20 км, для данных из остальных источников – 10 км. Выбор расстояния прореживания обусловлен изначальным пространственным распределением точек: такое расстояние позволило минимизировать эффект смещения выборки, но в то же время не убрать излишнее количество точек находок. В итоге после процедуры прореживания в модель была включена 131 точка из репозитория GBIF и 210 точек – из остальных, указанных выше, источников (рис. 1).

Набор данных должен включать не только точки находок (точки присутствия), но и точки, в которых вид не обнаружен (точки отсутствия). Собрать такие данные напрямую крайне затруднительно, поэтому в качестве точек отсутствия по умолчанию были приняты так называемые точки псевдоотсутствия. Они были сгенерированы случайным образом из фоновых точек исследуемой территории.

Регион исследования охватывал территории от 66° с.ш до 40° с.ш. и от 20° в.д. до 60° в.д., то есть Восточную Европу.

В качестве предикторов для моделей были использованы следующие факторы. Климатические переменные были взяты из базы данных WorldClim.org [39]. Первоначально было взято 19 биоклиматических факторов. Все переменные были протестированы на мультиколлинеарность и на основе значения VIF (variance inflation factor, коэффициент инфляции дисперсии) из этого набора были исключены коррелирующие переменные. Расчет VIF проводили с использованием пакета usdm [40] в среде R. В итоге в модель были включены восемь биоклиматических переменных со значением VIF от 1,48 до 5,47: ‘bio1’ (среднегодовая температура), ‘bio2’ (среднесуточный диапазон температур), ‘bio4’ (сезонность температуры), ‘bio8’ (средняя температура самого влажного квартала), ‘bio9’ (средняя температура самого засушливого квартала), ‘bio15’ (коэффициент вариации осадков), ‘bio18’ (осадки самого теплого квартала), ‘bio19’ (осадки самого холодного квартала).

Также в качестве предикторов использовались тип земельных угодий (landcover) и расширенный вегетационный индекс EVI (enhanced vegetation index), которые созданы на основе снимков спутникового сенсора MODIS (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer). Данные по этим предикторам взяты с платформы открытого доступа earthexplorer.usgs.gov. Эти предикторы были выбраны ввиду того, что они косвенно характеризуют биотопы, пригодные для обитания *C. laminata*: тип земельных угодий несет информацию о разделении территории на земли разного назначения, а вегетационный индекс характеризует биомассу растительности на той или иной территории поверхности суши. Как уже было сказано, *C. laminata* населяет лесные биотопы (landcover «поможет» моделям их выделить), а наиболее благоприятные для вида лесные биотопы предположительно могут отличаться по значениям EVI от остальных, что тоже внесет вклад в прогноз.

Для моделирования использовались следующие алгоритмы: обобщенная аддитивная модель (generalized additive model, GAM), метод опорных векторов (support vector machine, SVM) и многослойный перцептрон (multilayer perceptron, MLP). Первый алгоритм относится к регрессионным, а остальные – к методам машинного обучения. При построении моделей была применена кросс-

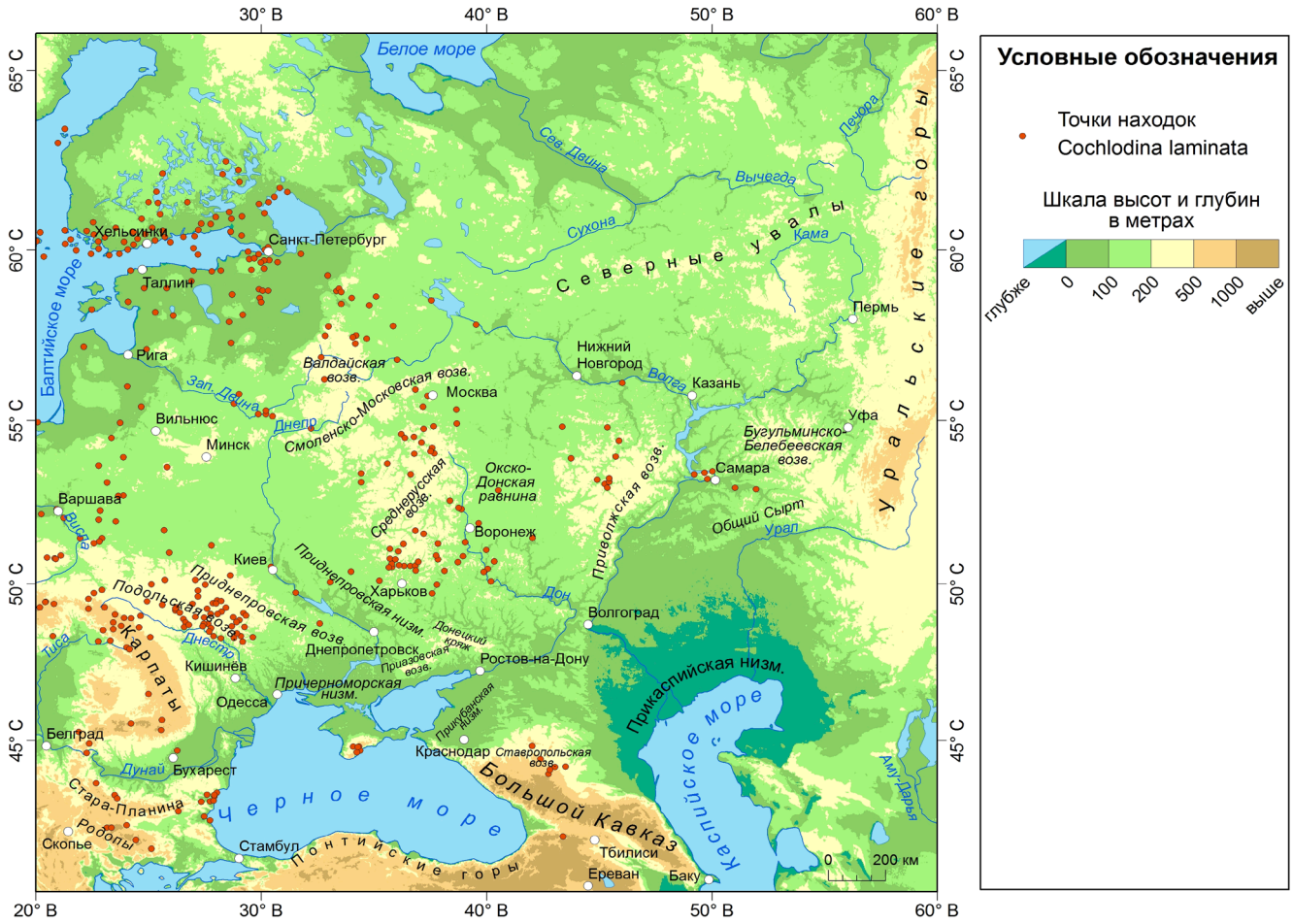
валидация (перекрестная проверка) выборки методом пятикратной перегруппировки. Процедура кросс-валидации предполагает разделение исходной выборки на обучающую и тестовую. В нашем случае 25% исходной выборки были включены в тестовую, а 75% – в обучающую выборку. То есть модель обучается на одной части данных, а результат моделирования проверяется на другой части данных. Такая операция проводится несколько раз, при этом каждый раз обучающая и тестовая выборки формируются случайным образом, за счет чего снижается эффект смещения выборки [41]. Основными показателями прогностической способности модели является чувствительность и специфичность. Чувствительность характеризует долю истинно положительных прогнозов, специфичность – долю ложноположительных прогнозов. На основе этих показателей для оценки качества прогноза была вычислена площадь под ROC-кривой (area-under-the-curve, AUC), скорректированное отношение шансов (COR, crude odds ratio), а также была рассчитана TSS-статистика (true skill statistic, известна также как критерий Пирса-Обухова) [42, 43]. Для усреднения результатов моделирования разных алгоритмов мы также построили ансамблевую модель по взвешенным результатам всех моделей.

Моделирование и основная часть подготовительных работ с данными были проведены в среде R версии 4.1.2 [44] преимущественно с использованием пакета «sdm» [45]. Обработка растровых изображений с предикторами также осуществлялась в программе ArcGIS версии 10.7.

Результаты и их обсуждение

Прогноз распространения вида представлен в виде картосхем со шкалой пригодности территории для обитания вида от 0 до 1 (рис. 2). Результаты моделирования несколько разнятся в зависимости от примененных алгоритмов. Заметно, что прогноз на основе алгоритмов GAM и MLP дает, с одной стороны, более фрагментированную картину, но с другой стороны, площадь пригодной для обитания *C. laminata* территории в этих моделях больше, чем в SVM. Последний показывает более «заполненную» территорию, в том числе на тех участках, на которых не были отмечены точки встречаемости из-за дефицита данных. В частности, это касается территории Белоруссии.

Во всех случаях заметен клин в восточном направлении, который достигает Предуралья (во всех моделях), либо даже доходит до Урала (в моделях GAM и MLP).


30° В
40° В
50° В
60° В
65° С
60° С
55° С
50° С
45° С
20° В
Белое море
Баренцево море
Баренцево море
Баренцево

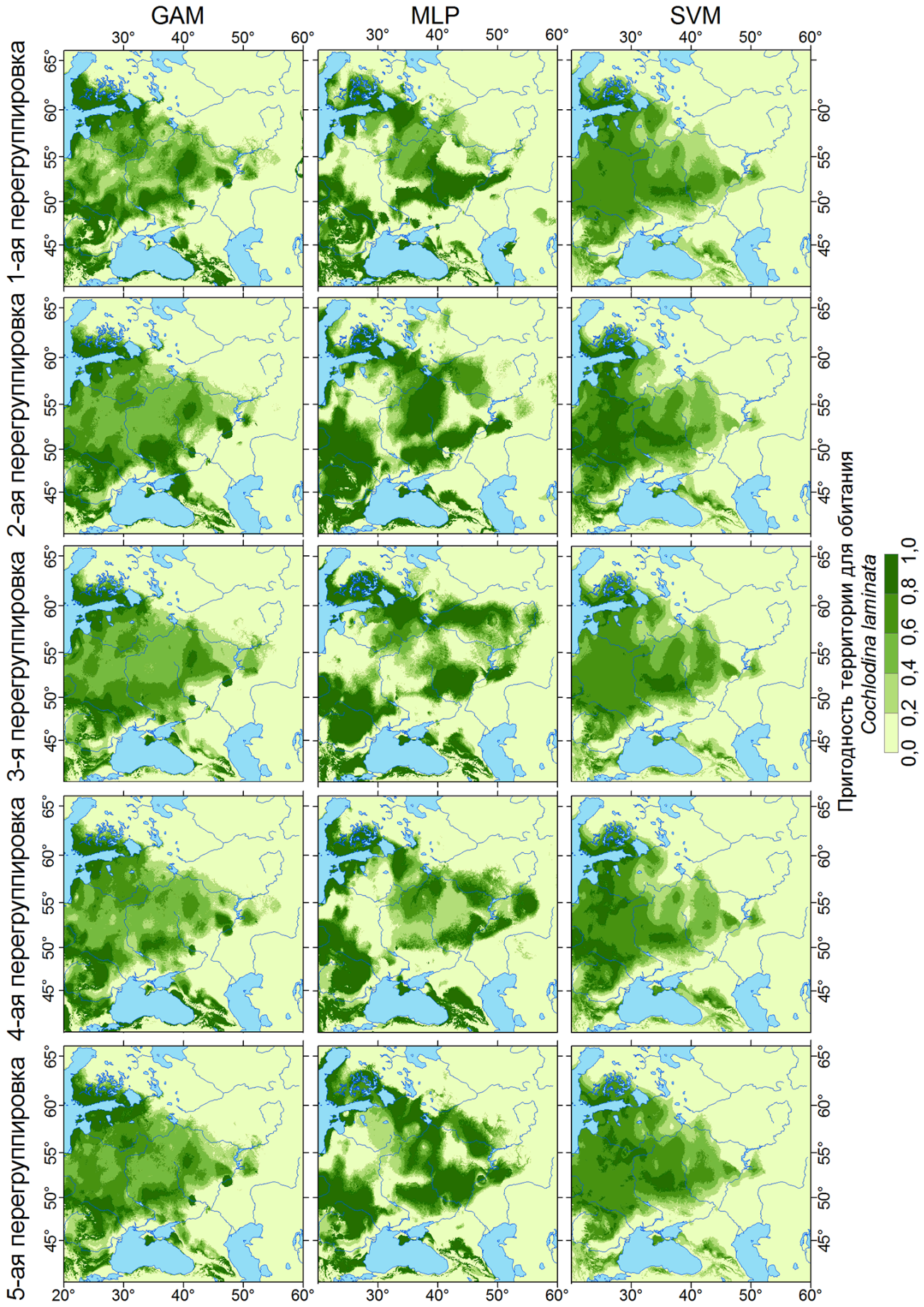


Рис. 2. Результат моделирования распространения *Cochlodina laminata*, полученный с помощью разных алгоритмов.

Таблица

Статистические показатели моделей

Алгоритмы	AUC	COR	TSS
GAM	0,82	0,55	0,50
MLP	0,83	0,54	0,56
SVM	0,83	0,59	0,58

Примечание: AUC (area-under-the-curve) – площадь под ROC-кривой, COR (crude odds ratio) – отношение шансов, TSS (true skill statistic) – TSS-статистика

Показатели площади под ROC-кривой, характеризующие предсказательную способность моделей, имеют сопоставимые и довольно высокие значения для разных моделей (таблица). Также у разных моделей после процедуры перегруппировки оказались сопоставимые статистические показатели.

Ансамблевый прогноз демонстрирует усредненный результат по всем моделям (рис. 3). Здесь также виден клин, который в крайней восточной точке достигает Предуралья. В южной половине этого клина (то есть в лесостепной и отчасти в степной зоне) территории с высокой степенью пригодности для обитания вида расходятся в виде полос от юга Среднерусской возвышенности до юго-востока Донецкого кряжа. Отдельные крайне небольшие участки отмечены на территории юга Приднепровской возвышенности и Причерноморской низменности. Ожидаемо, основная часть степной зоны – территории Причерноморской низменности, Приазовской возвышенности, Прикубанской низменности до Прикаспийской низменности и юга Приволжской возвышенности – выходят за пределы ареала *C. laminata*.

В самой южной части ареала моллюска выделены территории Причерноморья, а именно – горная часть Крымского полуострова, северо-восточное Причерноморье, некоторая часть Кавказа, Понтийских гор и Балканы.

Среди предикторов, оказавших наибольшее влияние на прогноз, выделяется среднегодовая температура. Это можно видеть как по усредненным значениям для всех моделей, так и для каждого алгоритма по отдельности (рис. 4). Наиболее равномерно распределены вклады предикторов в моделях MLP, наименее равномерно – в регрессионных моделях. Тем не менее, если судить по усредненным значениям, то, за исключением среднегодовой температуры, вклад предикторов можно считать более-менее равнозначным. Помимо среднегодовой температуры, можно выделить сезонность температуры («bio4») и осадки самого теплого квартала («bio18»). Наименее значимой оказалась переменная «bio9» – средняя температура самого засушливого квартала. Примечательно, что тип земельных угодий и вегетационный индекс внесли заметный вклад в прогноз наряду с климатическими предикторами.

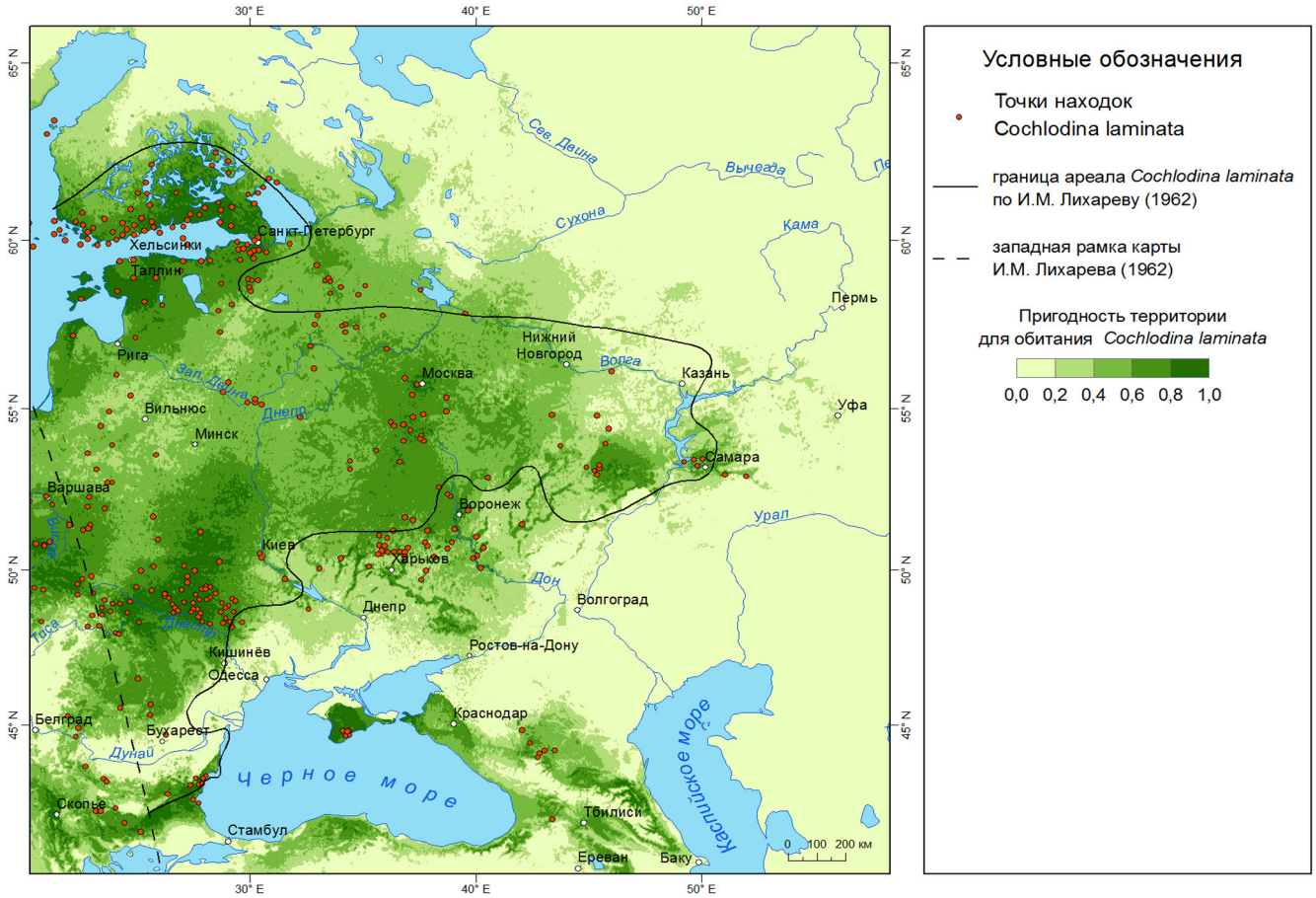


Рис. 3. Результат ансамблевого моделирования распространения *Cochlodina laminata*.

Необходимо заметить, что результат SDM представляет собой потенциальный ареал вида и показывает территорию, пригодную для его обитания [3]. Иными словами, прогноз на основе SDM нельзя воспринимать как однозначный ответ на вопрос о границах реального распространения вида. Тем не менее, результат SDM позволяет увидеть, на каких территориях наиболее оптимальные условия для обитания вида и где наиболее вероятно проходят границы пригодной для обитания территории.

Так как ансамблевый прогноз позволяет усреднить результаты моделирования для итогового предсказания [46], мы будем преимущественно ориентироваться на его результаты.

При сопоставлении нашего прогноза со схемой распространения *C. laminata*, предложенной И.М. Лихаревым (рис. 3) ясно видно, что большей частью они совпадают. А именно, точно совпадает центральная часть клинального ареала, ограничение которой Лихарев обуславливал сочетанием температуры и влажности. Однако, согласно нашим прогнозам, ареал *C. laminata* оказывается шире в юго-восточном направлении и отдельно в Причерноморье и на Кавказе. В северо-восточной части ареала также есть некоторые отличия: небольшая область (39° в.д., 62° с.ш.) в прогнозе отмечена как пригодная для обитания вида, что выходит за границы, очерченные Лихаревым. При этом есть и области, которые, напротив, на схеме И.М. Лихарева обозначены как часть ареала, а в ансамблевом прогнозе обозначены как малопригодные для обитания вида. Основной причиной такого расхождения вероятнее всего является недостаточная представленность данных. Это касается части Марийской низменности и севера Приволжской возвышенности (впадение р. Суры в Волгу).

Если сфокусироваться на юго-восточной части ареала *C. laminata*, которая наиболее интересовала нас, то можно выделить территории лесостепи и горных экосистем, которые входят в потенциальный ареал вида. В зоне лесостепи модели выделили лесные массивы, что отчетливо видно на картосхемах прогноза. Это обусловлено вкладом в модели EVI и типа земельных угодий. Известно, что использование предикторов разных типов, и в частности, данных дистанционного зондирования Земли, существенно улучшает качество моделей [47]. В нашем случае это позволяет обозначить пригодные для обитания территории на периферии ареала более точно.

В южной части потенциального ареала – на Кавказе, Понтийских горах и в горном Крыму выделены территории, соответствующие определенным значениям EVI. Как в Крыму, так и на Кавказе видовое разнообразие клаузилид довольно высокое, включая эндемичные виды [1, 48–50]. Для Крыма довольно хорошо известны экологические особенности разных видов клаузилид, их экологическое разделение по локальным местообитаниям [51–54]. О распространении *C. laminata* в горном Крыму известно достаточно давно. Согласно И.И. Пузанову (1925) [55] вид населяет всю

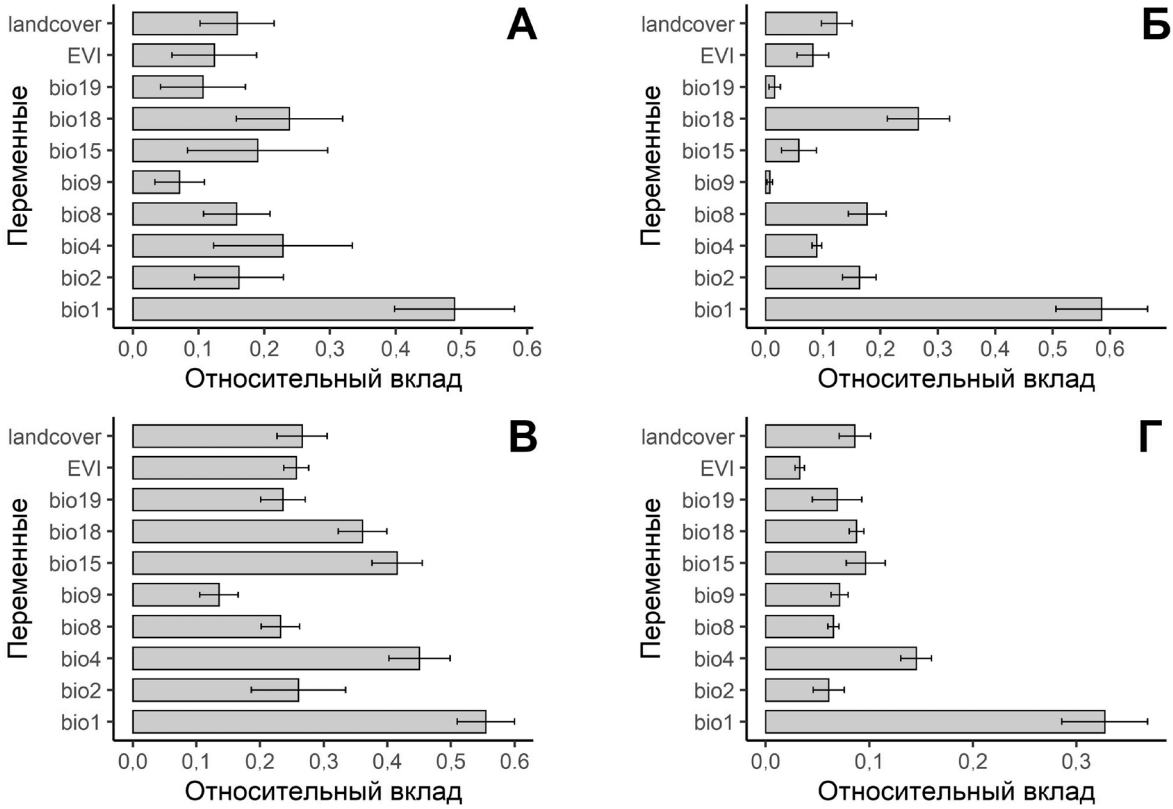


Рис. 4. Вклад предикторов в модели: **А** – усредненные значения для всех моделей; **Б** – значения для GAM; **В** – значения для MLP; **Г** – значения для SVM.

зону буковых лесов, а по данным А.А. Байдашникова (1990) [51] известно, что в Крыму распространение *C. laminata* ограничено лесами северных склонов. О распространении *C. laminata* на Кавказе и Понтийских горах сведений практически нет, за исключением данных по Северному Кавказу, которые мы использовали в наборе исходных данных. Несмотря на наличие пригодных для обитания территорий, в этом регионе распространению вида препятствовали географические барьеры. Таким образом, обозначенные территории в этом регионе попадают в потенциальный ареал ввиду оптимального сочетания условий среды, но расселения вида здесь, очевидно, не произошло.

По зоне лесостепи и степи проходит южная часть восточного клина ареала *C. laminata*. Территория потенциального ареала, которая проходит южнее границы И.М. Лихарева, относится к бассейну Дона и от Среднерусской возвышенности продолжается на Приволжскую возвышенность, немного не доходя до Общего Сырта. Если же взять во внимание не только ансамблевый прогноз, но и модели MLP и GAM, то клин проходит еще восточнее – фактически, до Урала.

Обращает на себя внимание неравномерность распределения пригодных для обитания вида территорий, что связано с неоднородностью рельефа и растительных сообществ, которые модель «распознала» по значениям EVI. Известно, что распространение *C. laminata* на Среднерусской возвышенности в основном приурочено к байрачным и плакорным дубравам, что описано в работе В.А. Николаева для основной части этой территории (1973) [56], а также описано для национального парка «Двуречанский» [57]. Помимо дубрав, *C. laminata* встречается в пойменных лесах, что отмечено и на территории Донецкого кряжа [58]. На Приволжской возвышенности вид встречается в дубравах, смешанных лесах, осинниках и остепененных лесах [16, 19, 20, 22]. К сожалению, пока нет описаний находок *C. laminata* в самой восточной части потенциального ареала. Но, согласно нашим моделям, такими потенциально пригодными для обитания вида территориями являются участки Бугульминско-Белебеевской возвышенности.

Заключение

Таким образом, потенциальный ареал наиболее широко распространенного в Европе вида сем. Clausiliidae *C. laminata* доходит до Предуралья. В юго-восточной части он охватывает Балканы, горный Крым, потенциально пригодные территории Кавказа, а также часть Понтийских гор. Фактически, вся зона лесостепи и некоторые участки в степной зоне в восточной части ареала *C. laminata* пригодны для обитания вида. Среди используемых нами предикторов наибольший вклад в прогноз внесли фактор среднегодовой температуры, сезонность температуры и осадки самого теплого квартала. Остальные факторы оказали примерно равное влияние на модели.

Авторы выражают благодарность П.В. Кияшко за возможность работы с коллекцией Зоологического института РАН. Мы искренне благодарим Е.В. Шикова и А.В. Сысоева за предоставленные данные. Отдельная благодарность Е.В. Брагиной и анонимным рецензентам за ценные комментарии. Исследования проводили без проведения экспериментов над животными и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лихарев И.М. *Фауна СССР. Моллюски. Т. 3. Вып. 4: Клаузилиды (Clausiliidae)*. М.; Л.: Изд-во АН СССР; 1962. 318 с.

2. Elith J., Leathwick J.R. Species distribution models: Ecological explanation and prediction across space and time. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*. 2009;40:677–697.

3. Lissovsky A.A., Dudov S.V., Obolenskaya E.V. Species-distribution modeling: advantages and limitations of its application. 1. General approaches. *Biol. Bull. Rev.* 2021;11(3):254–264.

4. Guisan A., Tingley R., Baumgartner J.B., et al. Predicting species distributions for conservation decisions. *Ecol. Lett.* 2013;16(12):1424–1435.

5. Roy S., Suman A., Ray S., Saikia S.K. Use of species distribution models to study habitat suitability for sustainable management and conservation in the Indian subcontinent: A decade's retrospective. *Front. Sustain. Resour. Manag.* 2022;1:1031646.

6. Ovando X.M.C., Miranda M.J., Loyola R., Cuezzo M.G. Identifying priority areas for invertebrate conservation using land snails as models. *J. Nat. Conserv.* 2019;50:125707.

7. Pěknicová J., Berchová-Bímová K. Application of species distribution models for protected areas threatened by invasive plants. *J. Nat. Conserv*. 2016;34:1–7.

8. Goldsmit J., McKindsey C.W., Schlegel R.W., Stewart D.B., Archambault P., Howland K.L. What and where? Predicting invasion hotspots in the Arctic marine realm. *Glob. Change Biol*. 2020;2(9):4752–4771.

9. Curry P.A., Yeung N.W., Hayes K.A., Cowie R.H. The potential tropical island distribution of a temperate invasive snail, *Oxychilus alliarius*, modeled on its distribution in Hawaii. *Biol. Invasions*. 2020;22(2):307–327.

10. Bondareva O., Genelt–Yanovskiy E., Abramson N. Copse snail *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda: Helicidae) in the Baltic Sea region: Invasion or range extension? Insights from phylogeographic analysis and climate niche modeling. *J. Zool. Syst. Evol. Res*. 2020;58(1):221–229.

11. Zemanova M.A., Broennimann O., Guisan A., Knop E., Heckel G. Slimy invasion: Climatic niche and current and future biogeography of Arion slug invaders. *Divers. Distrib*. 2018;24(11):1627–1640.

12. Adamova V.V., Orlov M.A., Sheludkov A.V. Land snails Brephulopsis cylindrica and Xeropicta derbentina

(Gastropoda: Stylommatophora): case study of invasive species distribution modelling. *Ruthenica*. 2022;22(3):121–136.

13. Алексанов В.В., Рулева О.А., Галемина И.Е. Кадастр наземных моллюсков города Калуги. *Исследования биологического разнообразия Калужской области. Серия «Кадастровые и мониторинговые исследования биологического разнообразия в Калужской области». Вып. 4.* Тамбов: ООО «ТПС»; 2019:73–95.

14. Коцур В.М. Биотопическое распределение наземных моллюсков (Mollusca, Gastropoda) г. Витебска. *Веснік ВДУ*. 2013;6(78):60–65.

15. Маматкулов А.Л. Биология размножения некоторых видов восточноевропейских Clausiliidae (Mollusca, Pulmonata). *Зоол. журн*. 2007;86:403–414.

16. Стойко Т.Г., Комарова Е.В., Безина О.В. Сообщества наземных моллюсков на меловых склонах в лесостепи (Среднее Поволжье). *Изв. Самар. науч. центра РАН*. 2014;16:142–147.

17. Kowalczyk-Pecka D., Czepiel-Mil K. The effect of accumulation of metals on selected physiological biomarkers in Cochlodina (Cochlodina) laminata (Pulmonata:Clausiliidae) inhabiting urban biocenoses. *Environ. Prot. Nat. Resour.* 2013;24(2):45–49.

18. Шипчина М.А. К фауне наземных моллюсков лесостепной зоны Самарской области. *Вестн. Морд. ун-та. Сер. Биол. науки*. 2008;2:148–149.

19. Сачкова Ю.В. Комплексы наземных моллюсков лесостепного Заволжья. *Изв. Самар. науч. центра РАН*. 2009;1(4):650–653.

20. Сачкова Ю.В. Исследование наземных моллюсков на Самарской Луке. *Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии*. 2009;18(3):138–145.

21. Стойко Т.Г., Булавкина О.В. Материалы по фауне наземных моллюсков Пензенской области (Часть II). *Известия ПГПУ им. В. Г. Белинского*. 2008;10(14):66–71.

22. Стойко Т.Г., Булавкина О.В., Мазей Ю.А. Сообщества наземных моллюсков в осиновых лесах правобережья Среднего Поволжья. *Зоол. журн*. 2010;89(5):519–527.

23. Коцур В.М. Наземные моллюски (Mollusca, Gastropoda) сероольховых лесов Белорусского Поозерья. *Весник МДПУ им. И. П. Шамякина*. 2015;6(78):26–32

24. Балашев И.А., Брусенцова Н.А. Наземные моллюски национального природного парка “Слобожанский” (Харьковская обл., Украина). *Зоол. журн*. 2015;94(11):1249–1256.

25. Балашев И.А., Байдашников А.А., Романов Г.А., Гураль–Сверлова Н.В. Наземные моллюски Хмельницкой области (Подольская возвышенность, Украина). *Зоол. журн*. 2013;92(2):154–166.

26. Байдашников А.А Наземные моллюски (Gastropoda, Pulmonata) заповедника «Медоборы» (Подольская возвышенность). *Вестн. зоол*. 2002;36(2):73–76.

27. Байдашников А.А. Наземная малакофауна Украинского Полесья. Сообщение 2. Формирование наземных малакокомплексов. Вестн. зоол. 1996;30(3):3–12.

28. Балашев И.А., Байдашников А.А. Наземные моллюски (Gastropoda) Винницкой области (Украина) и их биотопическая приуроченность. *Вестн. зоол*. 2012;46(1):19–28.

29. GBIF Academy of Natural Sciences. MAL. Occurrence dataset [Электронный ресурс]. URL: https://doi.org/10.15468/xp1dhx/ (дата обращения: 25.04.2022).

30. GBIF Natural History Museum. Natural History Museum (London) Collection Specimens [Электронный ресурс]. 2022. URL: https://doi.org/10.5519/0002965/ (дата обращения: 25.04.2022).

31. GBIF Roasto R. Estonian Nature Observations Database. Version 87.15. Estonian Environment Information Centre. [Электронный ресурс]. 2019. URL: https://doi.org/10.15468/dlblir/ (дата обращения: 25.04.2022).

32. GBIF Harvard University M., Morris P. J. Museum of Comparative Zoology, Harvard University. Version 162.311. Museum of Comparative Zoology, Harvard University. [Электронный ресурс]. 2022. URL: https://doi.org/10.15468/p5rupv/ (дата обращения: 25.04.2022).

33. GBIF Estonian Naturalists’ Society. Estonian Naturalists’ Society. [Электронный ресурс]. URL: https://doi.org/10.15468/bmk3ab/ (дата обращения: 25.04.2022).

34. GBIF Finnish Biodiversity Information Facility. Lajitietokeskus/FinBIF – Notebook, general observations. [Электронный ресурс]. 2022. URL: https://doi.org/10.15468/4g56tp/ (дата обращения: 25.04.2022).

35. GBIF Finnish Biodiversity Information Facility. Hatikka.fi observations. [Электронный ресурс]. 2022. URL: https://doi.org/10.15468/te1t6l/ (дата обращения: 25.04.2022).

36. GBIF Finnish Biodiversity Information Facility. Mollusca (Luomus). [Электронный ресурс]. 2022. URL: https://doi.org/10.15468/nzy2re/ (дата обращения: 25.04.2022).

37. GBIF Adam Mickiewicz University in Poznań. Natural History Collections of the Faculty of Biology AMU. [Электронный ресурс]. URL: https://doi.org/10.15468/54hgbz/ (дата обращения: 25.04.2022).

38. Aiello-Lammens M.E., Boria R.A., Radosavljevic A., Vilela B., Anderson R.P. spThin: an R package for spatial thinning of species occurrence records for use in ecological niche models. *Ecography*. 2015;38:541–545.

39. Fick S., Hijman R. WorldClim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land area. *Int. J. Climatol.* 2017;37(12):4302–4315.

40. Naimi B., Hamm N.A.S., Groen T.A., Skidmore A.K., Toxopeus A.G. Where is positional uncertainty a problem for species distribution modelling? *Ecography*. 2014;37(2):191–203.

41. Yates L.A., Aandahl Z., Richards S.A., Brook B.W. Cross validation for model selection: A review with examples from ecology. *Ecol. Monogr.* 2023;93(1):e1557.

42. Allouche O., Tsoar A., Kadmon R. Assessing the accuracy of species distribution models: prevalence, kappa and the true skill statistic (TSS): Assessing the accuracy of distribution models. *J. Appl. Ecol.* 2006;43(6):1223–1232.

43. Hirzel A.H., Le Lay G., Helfer V., Randin C., Guisan A. Evaluating the ability of habitat suitability models to predict species presences. *Ecol. Modell.* 2006;199(2):142–152.

44. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Электронный ресурс]. 2022. URL: https://www.R-project.org/ (дата обращения: 25.04.2022).

45. Naimi B., Araújo M.B. sdm: a reproducible and extensible R platform for species distribution modelling. *Ecography*. 2016;39(4):368–375.

46. Araujo M., New M. Ensemble forecasting of species distributions. *Trends Ecol. Evol*. 2007;22(1):42–47.

47. Wilson J.W., Sexton J.O., Todd Jobe R., Haddad N.M. The relative contribution of terrain, land cover, and vegetation structure indices to species distribution models. *Biol. Conserv*. 2013;164:170–176.

48. Акрамовский Н.Н. *Фауна Армянской ССР. Моллюски*. Ереван: Изд-во АН АРМ ССР; 1976. 272 с.

49. Koch E.L., Neiber M.T., Walther F., Hausdorf B. Presumable incipient hybrid speciation of door snails in previously glaciated areas in the Caucasus. *Mol. Phylogenet. Evol*. 2016;97:120–128.

50. Walther F., Kijashko P., Harutyunova L., Mumladze L., Neiber M.T., Hausdorf B. Biogeography of the land snails of the Caucasus region. *Tentacle*. 2014;22:3–5.

51. Байдашников А. А. Восточно-европейские равнинные виды наземных моллюсков в фауне Горного Крыма. *Вестн. зоол*. 1990;6:68–70.

52. Байдашников А.А. Морфологические предпосылки стенобионтности Clausiliidae (Gastropoda, Pulmonata). *Вестн. зоол*. 2003;37(6):49–63.

53. Байдашников А.А. Изменчивость наземных моллюсков крымского рода *Mentissa* (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae). *Вестн. зоол*. 2006;40(4):297–310.

54. Neiber M.T., Helfenrath K., Walther F., Hausdorf B. Ecological specialization resulting in restricted gene flow promotes differentiation in door snails. *Mol. Phylogenet. Evol*. 2019;141: 106608.

55. Пузанов И.И. Материалы к познанию наземных моллюсков Крыма. *Бюлл. МОИП*. 1925;33(1–2):48–101.

56. Николаев В.А. *Наземные моллюски Среднерусской возвышенности. Дисс. канд. биол. наук*. Орел; 1973. 240 с.

57. Балашев И.А., Кривохижая М.В. Закономерности распределения наземных моллюсков по меловой степи и прилегающим фитоценозам долины р. Оскол в Национальном природном парке “Двуречанский” (Украина). *Экология*. 2015;4:300–307.

58. Гураль-Сверлова Н.В. Пространственное распределение наземной малакофауны степной зоны Украины. *Ruthenica*. 2018;28(4):131–138.

Поступила в редакцию 28.10.2023
После доработки 05.04.2024
Принята в печать 12.04.2024

RESEARCH ARTICLE

Modeling the spatial distribution of the European land snail *Cochlodina laminata* (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae) in the eastern part of the range

V.V. Adamova[1, *], P.A. Ukrainskiy[2]

[1]Department of Biology, Institute of Pharmacy, Chemistry and Biology, Belgorod State National Research University, Pobeda st., 85, Belgorod, 308015, Russia;

[2]Center for Validation and Verification of Carbon Units, Institute of Geosciences, Belgorod State National Research University, Pobeda st., 85, Belgorod, 308015, Russia

[*]e-mail: valeriavladislavna@gmail.com

Species distribution modeling (SDM) allows to define the potential range and identify key factors that determine the habitat suitable areas. In this study, we made forecasts for the distribution of the European clausilid *Cochlodina laminata* (Montagu, 1803) in the eastern part of the range using SDM methods. Various algorithms are used to create models, including machine learning algorithms. We selected climatic factors and Earth remote sensing (ERS) data as predictors (extended vegetation index and land use). An ensemble forecast based on all models showed that the range of *C. laminata* is a wedge-shaped and largely coincides with the scheme proposed earlier by I.M. Likharev. However, in the eastern and southeastern parts the potential range turned out to be wider. The boundaries of the *C. laminata* potential distribution have been established in the forest-steppe and steppe zones, as well as in the Black Sea region and the Caucasus. The use of remote sensing data made it possible to identify suitable territories in more detail, which is especially important in the peripheral zones of the range. It is shown that the most significant factors in the distribution of the species in the studied area are the average annual temperature, temperature seasonality and precipitation of the warmest quarter.

Keywords: *ecological modeling, SDM, clausilids, regression models, machine learning, Eastern Europe*

Сведения об авторах

Адамова Валерия Владиславовна – канд. биол. наук, доц. кафедры биологии института фармации, химии и биологии НИУ «БелГУ». Тел.: 8-4722-30-14-10; e-mail: valeriavladislavna@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8329-4670

Украинский Павел Александрович – канд. геогр. наук, эксперт центра валидации и верификации углеродных единиц института наук о Земле НИУ «БелГУ». Тел.: 8-4722-30-13-72; e-mail: pa.ukrainski@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7234-592X

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 571.27

Особенности образования нейтрофильных внеклеточных ловушек у кроликов породы шиншилла

Н.В. Воробьева[1, *], М.С. Мунтян[2]

[1]Кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

[2]НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

[*]e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET, Neutrophil Extracellular Traps) представляют собой деконденсированный ядерный хроматин, «декорированный» бактерицидными белками различных органелл клетки и выполняющий эффекторную функцию, направленную на борьбу с патогенами в очаге воспаления. Вместе с тем, NET играют важную роль в патогенезе многих аутоиммунных и воспалительных заболеваний, а также злокачественных новообразований. Кролики являются одним из наиболее часто используемых видов лабораторных животных в медицинских и биологических исследованиях. На кроликах разработано большое количество моделей различных заболеваний сердечно-сосудистой, иммунной и других систем человека. Однако в научной литературе отсутствуют сведения о способности нейтрофилов кролика подвергаться NETозу (программируемой гибели клеток в процессе образования NET) в ответ на известные фармакологические стимулы. Целью представленной работы было изучение в системе *in vitro* способности нейтрофилов кролика породы Советская шиншилла образовывать NET в ответ на миметик диацилглицерола форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) и кальциевый ионофор А23187. Для выделения нейтрофилов кролика использовали метод центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Hypaque с модификациями. Окислительный взрыв оценивали методом регистрации люминол-зависимой хемилюминесценции, а образование NET – с помощью иммунофлуоресцентного анализа. В работе впервые показано, что нейтрофилы кролика Советская шиншилла не образуют NET в ответ на ФМА, но формируют ловушки в ответ на А23187, а также обладают низким уровнем окислительного взрыва в ответ на ФМА, А23187 и хемоаттрактант *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланин.

Ключевые слова: *нейтрофилы кролика, нейтрофильные внеклеточные ловушки, NET, окислительный взрыв, форбол-12-миристат-13-ацетат, А23187*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-1-7

Открытие Артуро Циклински [1] в 2004 г. нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET, Neutrophil Extracellular Traps) привлекло внимание большого числа исследователей и стимулировало огромное количество научных публикаций. Подавляющее большинство этих работ было проведено на нейтрофилах человека или грызунов (мышей и крыс). Показано, что NET состоят из остова хроматина, деконденсированного до нуклеосомного уровня упаковки ДНК и «декорированного» несколькими десятками типов белков гранул (миелопероксидаза, МПО; эластаза), ядра (гистоны) и цитоплазмы [2]. Индукторами образования NET являются разнообразные физиологические стимулы, такие как бактерии, грибы, вирусы и простейшие [1], а также химические стимулы, антитела, иммунные комплексы, хемокины, цитокины и хемоаттрактанты. Наиболее широко используемыми фармакологическими стимулами образования NET являются форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) и кальциевые ионофоры (иономицин, А23187). Высвобождение хроматина было постулировано как новая эффекторная функция нейтрофилов для борьбы с патогенами, дополняющая фагоцитоз, дегрануляцию и генерацию активных форм кислорода (АФК). Впоследствии выяснилось, что хроматин могут выделять и другие гранулоциты, например, эозинофилы, базофилы и тучные клетки, а также моноциты, макрофаги и В-лимфоциты [3]. Вскоре

© Воробьева Н.В., Мунтян М.С., 2024

стало ясно, что нейтрофилы многих млекопитающих, включая кошек, собак, крупный рогатый скот, овец, коз и свиней, выделяют хроматин для защиты хозяина от патогенов [4]. Сообщалось, что специфические клетки птиц и рыб [4], некоторых представителей беспозвоночных [5] и растений [6] также способны высвобождать ядерный хроматин. Таким образом, выделение хроматина, направленное на защиту хозяина от патогенов, является эволюционно консервативным механизмом.

Однако впоследствии оказалось, что, помимо защитной функции, NET играют важную роль в патогенезе таких аутоиммунных и воспалительных заболеваний, как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, васкулит мелких сосудов и псориаз [7–11], а также злокачественных новообразований [12]. Таким образом, существует тонкий баланс между высвобождением NET и их своевременным устранением, что обеспечивает защитные или повреждающие последствия их образования.

Кролики являются одним из наиболее часто используемых видов лабораторных животных в медицинских и биологических исследованиях. На них разработано большое количество моделей различных болезней человека, в частности, заболеваний сердечно-сосудистой и иммунной систем. Поскольку кролики имеют больше общих офтальмологических характеристик с людьми по сравнению с мелкими грызунами, это делает их удобной моделью для исследований в области офтальмологии и изучения таких заболеваний человека, как синдром сухого глаза, глаукома, катаракта и увеит [13–15]. Хотя в научной литературе отсутствуют данные о способности нейтрофилов кроликов развивать NETоз в ответ на фармакологические стимулы в системе *in vitro*, образование NET недавно было обнаружено в легких и печени кроликов, инфицированных возбудителем туляремии Francisella tularensis [16].

Ввиду широкого использования кроликов для разработки моделей ряда заболеваний человека, важно также учитывать способность их нейтрофилов образовывать NET как фактор патогенеза воспалительных и аутоиммунных процессов. В связи с этим целью работы было изучение способности нейтрофилов кроликов породы Советская шиншилла образовывать NET в ответ на классические активаторы NETоза, ФМА и A23187, в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Реагенты. ФМА, A23187, *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP, *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine), диметилсульфоксид, Тритон X-100 были приобретены в компании Sigma-Aldrich (США). SYBR Green, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), смола ProLong Gold и моноклональные FITC-меченные антитела к МПО были закуплены в Thermo Fisher Scientific (Invitrogen, США), декстран Т-500 – в Pharmacosmos (Дания).

Выделение первичных нейтрофилов из крови кроликов породы Советская шиншилла. Все исследования с кровью проводились в соответствии с биоэтическими нормами Европейского Союза и РФ. Нейтрофилы кролика выделяли с использованием одноступенчатого градиента Ficoll-Hypaque, ранее разработанного для выделения нейтрофилов человека [17], однако с небольшими модификациями. Периферическую кровь кроликов отбирали из ушной вены в полипропиленовые пробирки с гепарином (20 МЕ × мл$^{-1}$ крови). Цельную кровь разводили средой 199 в соотношении 1:1 и наслаивали на Ficoll-Hypaque с плотностью 1,077 г/см^3. Центрифугирование проводили при 478 g в течение 30 мин и комнатной температуре. Эритроцитарную массу доводили до первоначального объема крови, добавляли декстран Т-500 (конечная концентрация – 1%) и оставляли на 15 мин для осаждения основной массы эритроцитов. Верхний прозрачный слой отбирали, доводили средой 199 до 10 мл и проводили центрифугирование при 400 g в течение 10 мин. Оставшиеся эритроциты лизировали в гипотоническом растворе хлорида натрия (0,2%-ный NaCl) в течение 30 с и далее восстанавливали изотоничность путем добавления гипертонического раствора хлорида натрия (1,6%-ный NaCl). Осаждали клетки при 400 g в течение 10 мин и разводили осадок в полной культуральной среде, содержащей RPMI 1640, 10 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин и 1%-ную инактивированную эмбриональную телячью сыворотку, для последующего исследования NETоза. Для исследования окислительного взрыва осадок суспендировали в фосфатном буфере Кребса-Рингера (120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,7 мМ KH_2PO_4, 8,3 мМ Na_2HPO_4, 10 мМ глюкоза, 1 мМ $CaCl_2$, 1,5 мМ $MgCl_2$, pH – 7,3). Полученные клетки были представлены на 92% нейтрофилами, а их жизнеспособность составляла не менее 99%, что определяли по исключению 0,1%-ного трипанового синего. Изменение условий центрифугирования в градиенте плотности позволило выделять нейтрофилы кролика в количестве 1,5–2,0 × 10^6 на 1 мл цельной крови, что коррелирует с данными литературы [18]. Нейтрофилы инкубировали в течение 1 ч при 4°C перед экспериментом для достижения состояния покоя.

Оценка люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). ЛЗХЛ использовали для оценки суммарных АФК (внутри- и внеклеточных), как описано ранее [17]. В лунки 96-луночного планшета добавляли нейтрофилы кролика в количестве 2,5 × 10^5 клеток в фосфатном буфере Кребса-Рингера, люминол (80 мкМ – конечная концентрация) и один из активаторов окислительного взрыва – A23187 (2,5 мкМ), ФМА (35 нМ) или fMLP (800 нМ). Планшет немедленно помещали в хемилюмино-

метр Lucy 1 (Anthos Labtec, Австрия) для регистрации ЛЗХЛ. По окончании ЛЗХЛ оценивали площадь, занимаемую кривыми хемилюминесценции (суммарная эмиссия света), и степень окислительного взрыва выражали в виде гистограмм.

Индукция и иммунофлуоресцентное окрашивание NET. Свежевыделенные нейтрофилы кролика (2×10^5 кл/мл в 500 мкл полной культуральной среды), адгезированные на круглых покровных стеклах, находящихся в лунках 24-луночного планшета, стимулировали ФМА (35, 50, 100 нМ) или 2,5 мкМ А23187 в течение 3 ч и 4 ч соответственно. После стимуляции NETоза клетки фиксировали в лунках в 200 мкл 4%-ного раствора параформальдегида в течение 15 мин. Препараты окрашивали проникающим через мембраны клеток красителем SYBR Green, разведенным в фосфатно-солевом буфере (PBS, phosphate-buffered saline) в соотношении 1:10000 в соответствии с рекомендацией производителя, в течение 7 мин в темноте. Для иммунофлуоресцентного окрашивания фиксированные нейтрофилы промывали в PBS и пермеабилизировали с Тритоном X-100 в течение 1 мин при комнатной температуре. Неспецифическое связывание уменьшали путем инкубации клеток в блокирующем буфере (иммуноглобулины человека) в течение 20 мин. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили с использованием FITC-меченных моноклональных антител против МПО. Хроматин окашивали флуоресцентным красителем DAPI в течение 10 мин. Стекла промывали 2 раза в PBS и 1 раз в дистиллированной воде, далее погружали в смолу ProLong Gold. Клетки анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM LB (Leica Microsystems, Германия), а фотографи-

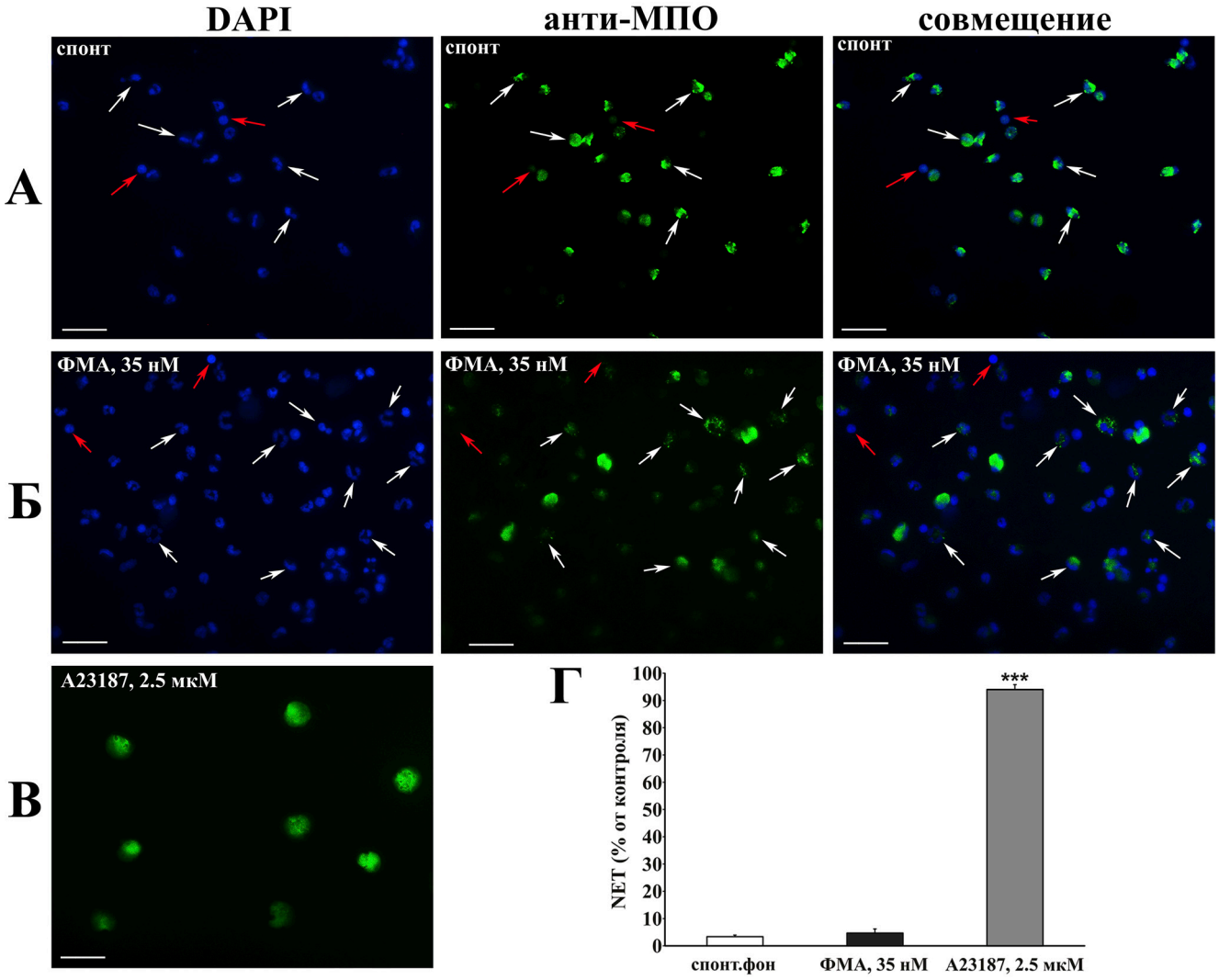


Рис. 1. Оценка NETоза, индуцированного в нейтрофилах кролика породы Советская шиншилла ФМА и А23187. Свежевыделенные нейтрофилы кролика, адгезированные на покровных стеклах, инкубировали в присутствии растворителя (**А**), ФМА (35 нМ) (**Б**) или А23187 (2,5 мкМ) (**В**) в течение 3 ч (ФМА) или 4 ч (А23187). Клетки фиксировали в 4%-ном параформальдегиде и окрашивали флуоресцентными красителями. (**А**) Для оценки чистоты выделения нейтрофилы кролика окрашивали DAPI (тест на хроматин, голубое свечение) и меченными FITC моноклональными антителами против МПО (зеленое свечение). Белые стрелки указывают на нейтрофилы, красные – на мононуклеары. Для оценки NETоза нейтрофилы кролика окрашивали меченными FITC моноклональными антителами против МПО и DAPI (**Б**) или SYBR Green (**В**). Масштаб – 25 мкм. (**Г**) Гистограмма, отражающая процент NETоза, индуцированного различными стимулами, n = 5, *** $p < 0{,}001$

рование проводили с помощью камеры Leica DC300F (Leica Microsystems, Германия). Подсчитывали общее количество клеток и количество нетотических клеток в каждом поле зрения, оценивали процент NETоза в нескольких полях зрения (не менее 500 клеток).

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software, США). Данные в тексте и на рисунках представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистический анализ осуществляли с использованием параметрических методов, статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Использование метода одноступенчатого градиента плотности Ficoll-Hypaque, ранее разработанного для выделения нейтрофилов человека [17], не позволило получить чистую фракцию нейтрофилов кролика – по-видимому, из-за плотностных особенностей этих клеток. В связи с этим в работе пришлось изменить ряд параметров выделения, что позволило нам получить чистую фракцию нейтрофилов. Чистоту выделения нейтрофилов оценивали в предварительных экспериментах с использованием меченных FITC моноклональных антител против МПО. МПО является компонентом азурофильных гранул нейтрофилов, которые отсутствуют в мононуклеарных клетках (моноциты, лимфоциты). В покоящихся нейтрофилах, как правило, можно наблюдать характерное распределение МПО в составе гранул, заполняющих цитозоль клетки, тогда как в нетотических нейтрофилах МПО колокализуется с деконденсированным хроматином. На рис. 1А можно видеть неактивированные нейтрофилы кролика, маркированные зеленой меткой (МПО, белые стрелки), в то время как отдельные мононуклеары такой маркировкой не обладают (красные стрелки).

Поскольку в научной литературе практически отсутствует информация о способности нейтрофилов кролика к NETозу [16], нам было интересно выяснить, будут ли эти клетки образовывать NET в ответ на классические активаторы этого процесса, ФМА и кальциевый ионофор А23187 в системе *in vitro*. Для этого клетки инкубировали в присутствии ФМА в возрастающих концентрациях (от 35 нМ до 100 нМ) или 2,5 мкМ А23187 в течение 3 ч и 4 ч соответственно. Результаты показали (рис. 1, Б и Г), что стимуляция нейтрофилов ФМА не приводит к заметной деконденсации хроматина, характерной для NETоза человека, хотя ядерные сегменты слегка увеличивались в размерах. Увеличение дозы ФМА до 100 нМ не способствовало каким-либо изменениям в сторону NETоза. В то же время инкубация нейтрофилов с А23187 в течение 4 ч приводила к практически 100%-ной деконденсации ядерного хроматина (рис. 1, В и Г).

Поскольку ФМА является миметиком диацилглицерола, который при активации связывается с протеинкиназой С, отсутствие ответа на ФМА можно бы было объяснить недостатком этого фермента или особенностями клеточной мембраны нейтрофилов кроликов, препятствующими свободному проникновению ФМА в клетки. Другим возможным объяснением может быть низкий уровень активации НАДФН-оксидазы и связанный с этим дефицит АФК, которые необходимы для индукции ФМА-индуцированного NETоза. Для проверки этой гипотезы мы провели оценку люминол-амплифицированного окислительного взрыва, индуцированного ФМА, А23187 и fMLP. На рис. 2 можно видеть, что все три классических активатора окислительного взрыва вызывали крайне низкую стимуляцию образования АФК у нейтрофилов кролика по сравнению с нейтрофилами человека, что может объяснить отсутствие у них NETоза в ответ на ФМА. Как нами было обнаружено ранее, NETоз в ответ на кальциевые ио-

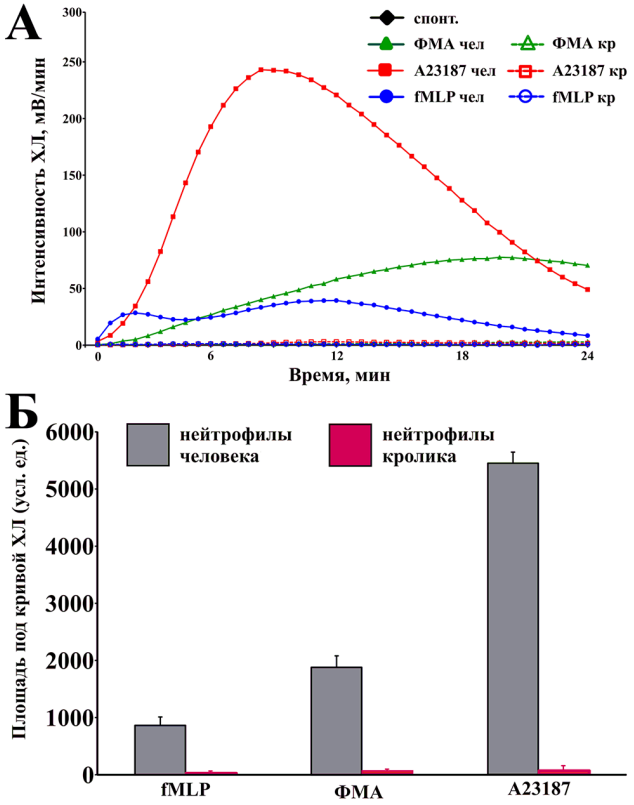


Рис. 2. Оценка окислительного взрыва нейтрофилов кролика, индуцированного различными стимулами. Нейтрофилы кролика стимулировали ФМА (35 нМ), А23187 (2,5 мкМ) или fMLP (800 нМ) в присутствии 80 мкМ люминола. Люминол-зависимую хемилюминесценцию (ЛЗХЛ) оценивали сразу после добавления стимулов в планшетном хемилюминометре Lucy 1. (**А**) Представлены типичные кинетические кривые ЛЗХЛ, индуцированной в нейтрофилах кролика активаторами окислительного взрыва. Для сравнения приведены типичные кинетические кривые ЛЗХЛ, полученные для нейтрофилов человека [17]. По оси абсцисс: время, мин. По оси ординат: интенсивность хемилюминесценции, мВ/мин. (**Б**) Представлена эмиссия света, индуцированная активаторами окислительного взрыва и выраженная в виде площади под кривыми ЛЗХЛ, n = 5.

нофоры может происходить и без стимуляции НАДФН-оксидазы и в основном зависит от митохондриальных АФК [19]. В этой связи, низкий уровень окислительного взрыва под влиянием А23187 не играет существенной роли в этом процессе. Что касается fMLP, то этот хемоаттрактант не является активатором образования NET [19].

В научной базе данных PubMed практически отсутствуют публикации, касающиеся способности нейтрофилов кроликов осуществлять NETоз. Только в единственной статье Пулавендран и соавт. [16] было показано в системе *in vivo*, что нейтрофилы кроликов выбрасывают NET в тканях легких и печени после инфицирования животных возбудителем туляремии. При этом NET не оказывали защитного действия от патогена. Отсутствие информации о NETозе у кроликов может быть связано, по нашему мнению, с превалированием у нейтрофилов этих животных иных эффекторных функций, например, фагоцитоза и дегрануляции. Вместе с тем, в связи с широким использованием кроликов в качестве лабораторных животных и тестированием на них большого количества химических препаратов, необходимо учитывать возможную активацию NETоза и его цитопатологическое действие на органы и ткани, а также его роль в патогенезе многих аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Таким образом, в представленной работе показано, что нейтрофилы кроликов породы Советская шиншилла не образуют NET в ответ на ФМА в широком диапазоне концентраций, однако с высокой интенсивностью выбрасывают NET в ответ кальциевый ионофор А23187. Отсутствие ответа на ФМА может быть обусловлено низким уровнем образования АФК как важного медиатора этого процесса.

Работа выполнена в рамках проекта «Молекулярные и клеточные основы иммунитета» (проект 21-1-21, номер ЦИТИС 121042600047-9). Образцы крови кроликов получали в компании «НПО Петровакс Фарм». Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены Комиссией по биоэтике «НПО Петровакс Фарм» (протокол 204092022, от 27 сентября 2022 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532–1535.

2. Urban C.F., Ermert D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., Nacken W., Brinkmann V., Jungblut P.R., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000639.

3. Vorobjeva N.V., Chelombitko M.A., Sud'ina G.F., Zinovkin R.A., Chernyak B.V. Role of mitochondria in the regulation of effector functions of granulocytes. *Cells.* 2023;12(18):2210.

4. Neumann A., Brogden G., von Köckritz-Blickwede M. Extracellular traps: an ancient weapon of multiple kingdoms. *Biology (Basel)*. 2020;9(2):34.

5. Zhang X., Zhuchenko O., Kuspa A., Soldati T. Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets. *Nat. Commun*. 2016;7:10938.

6. Hawes M., Allen C., Turgeon B.G., Curlango-Rivera G., Minh Tran T., Huskey D.A., Xiong Z. Root border cells and their role in plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol*. 2016;54:143–161.

7. Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. *Biochemistry (Mosc.)*. 2014;79(12):1286–1296.

8. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun. Rev*. 2015;14(7):633–640.

9. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Mosc.)*. 2020;85(10):1178–1190.

10. Vorobjeva N.V. Neutrophil extracellular traps: new aspects. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull*. 2020;75(4):173–188.

11. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol*. 2018;18(2):134–147.

12. Cools-Lartigue J., Spicer J., Najmeh S., Ferri L. Neutrophil extracellular traps in cancer progression. *Cell. Mol. Life Sci*. 2014;71(21):4179–4194.

13. Baksheeva V.E., Tiulina V.V., Iomdina E.N., et al. Tear nanoDSF denaturation profile is predictive of glaucoma. *Int. J. Mol. Sci*. 2023;24(8):7132.

14. Chistyakov D.V., Gancharova O.S., Baksheeva V.E., Tiulina V.V., Goriainov S.V., Azbukina N.V., Tsarkova M.S., Zamyatnin A.A., Jr., Philippov P.P., Sergeeva M.G., Senin I.I., Zernii E.Y. Inflammation in dry eye syndrome: identification and targeting of oxylipin-mediated mechanisms. *Biomedicines.* 2020;8(9):344.

15. Livingston E.T., Mursalin M.H., Callegan M.C. A Pyrrhic victory: the PMN response to ocular bacterial infections. *Microorganisms*. 2019;7(11):537.

16. Pulavendran S., Prasanthi M., Ramachandran A., Grant R., Snider T.A., Chow V.T.K., Malayer J.R., Teluguakula N. Production of neutrophil extracellular traps contributes to the pathogenesis of *Francisella* tularemia. *Front. Immunol*. 2020;11:679.

17. Vorobjeva N., Dagil Y., Pashenkov M., Pinegin B., Chernyak B. Protein kinase C isoforms mediate the formation of neutrophil extracellular traps. *Int. Immunopharmacol*. 2023;114:109448.

18. Kouoh F., Gressier B., Luyckx M., Brunet C., Dine T., Ballester L., Cazin M., Cazin J.C. A simple method for isolating human and rabbit polymorphonuclear neutrophils (PMNs). *Biol. Pharm. Bull*. 2000;23(11):1382–1383.

19. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshev S., Zinovkin R., Prikhodko A., Pinegin V., Kondratenko I., Pinegin B., Chernyak B. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020;1866(5):165664.

Поступила в редакцию 10.12.2023
После доработки 05.04.2024
Принята в печать 16.04.2024

RESEARCH ARTICLE

Peculiarities of neutrophil extracellular traps formation in chinchilla rabbits

N.V. Vorobjeva[1, *], M.S. Muntyan[2]

[1]Department of Immunology, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;
[2]Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–40 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia
[*]e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Neutrophil extracellular traps (NETs) are decondensed nuclear chromatin, decorated with bactericidal proteins of various cell organelles and performing an effector function aimed to combat pathogens at the site of inflammation. At the same time, NETs play an important role in the pathogenesis of many autoimmune and inflammatory diseases as well as malignancies. Rabbits are one of the most commonly used species of laboratory animals in medical and biological research. A large number of models of various diseases of the cardiovascular, immune and other human systems have been developed in rabbits. However, there is no information in the scientific literature about the ability of rabbit neutrophils to undergo NETosis in response to well-known pharmacological stimuli. The purpose of the present work was to study in *in vitro* system the ability of neutrophils of Soviet chinchilla rabbit to form NETs in response to mimetic of diacylglycerol phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and calcium ionophore A23187. To isolate rabbit neutrophils, the one-step density gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque method with modifications was used. Oxidative burst was assessed with luminol-amplified chemiluminescence method, and NET formation was assessed with immunofluorescence analysis. The work shows for the first time that neutrophils of Soviet chinchilla rabbit do not form NETs in response to PMA, but form traps in response to A23187, as well as have a low level of oxidative burst in response to PMA, A23187 and chemoattractant *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine.

Keywords: *rabbit neutrophils, neutrophil extracellular traps, NETs, oxidative burst, phorbol 12-myristate 13-acetate, A23187*

Funding: The research was carried out within the framework of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University (project No. 121042600047-9) and Interdisciplinary Scientific and Educational School of Lomonosov Moscow State University “Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology.”

Сведения об авторе

Воробьева Нина Викторовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-46; e-mail: nvvorobjeva@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5233-9338

Мунтян Мария Сергеевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела биоэнергетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-53-60; e-mail: muntyan@genebee.msu.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2332-5644

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК (599.323.43+599.363):591.05(470.22)

Содержание витаминов А и Е в тканях рыжей полевки (*Myodes* (*Clethrionomys*) *glareolus*) и обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus*), обитающих в Карелии

Т.Н. Ильина, И.В. Баишникова*, А.Е. Якимова, И.А. Зайцева

Институт биологии, Карельский научный центр Российской академии наук, Россия, 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11
**e-mail: iravbai@mail.ru*

Исследовали содержание витаминов А (ретинол) и Е (α-токоферол) в тканях рыжей полевки (*Myodes* (*Clethrionomys*) *glareolus*) и обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus*), обитающих на северной границе ареала. Распределение витамина А в тканях обоих видов было схожим, наибольшее содержание обнаруживалось в печени, наименьшее – в сердце. У обоих видов выявлены возрастные различия по уровню ретинола в почках, а также у бурозубки в скелетной мышце. Во всех органах у молодых бурозубок, которым предстояла зимовка, установлено достоверно более низкое содержание витамина Е по сравнению с взрослыми зимовавшими животными, в то время как у рыжей полевки таких возрастных различий обнаружено не было. Выявлены межвидовые различия по уровню витаминов А и Е в печени зимовавших зверьков. Полученные результаты показывают, что содержание витаминов А и Е в тканях рыжей полевки и обыкновенной бурозубки обусловлено характером обменных процессов и экологическими особенностями видов. У обыкновенной бурозубки уровень витаминов в значительной степени зависит от возраста.

Ключевые слова: *витамин А, витамин Е, метаболизм, возраст, сезон, млекопитающие*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-1-8

Введение

Среда обитания млекопитающих в районах субарктики подвержена глубоким сезонным изменениям. Для успешного выживания в условиях холодного климата животные выработали разнообразные физиологические адаптации, направленные на сохранение энергии и повышение устойчивости к холоду. В то же время, не только зима может быть сложным периодом для мелких млекопитающих, которые весной и летом сталкиваются с чрезвычайно высокими энергетическими потребностями в течение репродуктивного сезона [1–2].

Различия между видами мелких млекопитающих особенно проявляются в местообитаниях с высокой сезонностью и обусловлены поведенческими, анатомическими и физиологическими характеристиками животных [3]. Рыжая лесная полевка (*Myodes* (*Clethrionomys) glareolus* Schreber, 1780) и обыкновенная бурозубка (*Sorex araneus* Linnaeus, 1758) являются фоновыми видами в лесных сообществах Карелии. Общей экологической особенностью двух видов, принадлежащих к разным таксонам, является обитание в суженном годовом диапазоне внешних температур. Оба вида выработали приспособления для выживания зимой с низкими температурами окружающей среды – они не впадают в спячку и активны в течение холодного времени года. В то же время, грызуны и землеройки представляют собой два таксона с совершенно разной эволюционной историей. Мелкие насекомоядные и грызуны демонстрируют значительные различия в рационе питания, скорости метаболизма, репродуктивных стратегиях и др. Предполагается, что размножение, отложенное у землероек в условиях Карелии до второго календарного года жизни, является результатом отбора по признакам, обеспечивающим успешное выживание зимой – в период, который более сложен для землероек, чем для грызунов. У грызунов, напротив, оппортунистическое размножение является наиболее яркой характеристикой, которая помогает увеличивать репродуктивную отдачу и является основной стратегией в эволюции, возникшей в качестве реакции на повышенное истребление хищниками [1, 3–4]. В пессимальных условиях при увеличении общей смертности возрастает значение

© Ильина Т.Н., Баишникова И.В., Якимова А.Е., Зайцева И.А., 2024

ювенильного размножения для сохранения популяции [5–6].

Изучение механизмов стабильности популяций мелких млекопитающих включает исследование физиологических систем, прямо или косвенно реагирующих на изменения окружающей среды [7]. Одним из основных факторов, определяющих темпы индивидуального развития и продолжительность жизни, является скорость обмена веществ, которая у небольших короткоживущих видов очень высока. Мелкие млекопитающие используют набор морфологических и физиологических приспособлений, которые обеспечивают непрерывное снабжение тканей кислородом для поддержания окислительного метаболизма [8–9]. Высокий уровень аэробного обмена оказывает влияние на скорость накопления продуктов метаболизма, образующихся в реакциях свободнорадикального окисления и в других процессах, поэтому среди сезонных адаптаций незимоспящих мелких млекопитающих значительный интерес может представлять изменение состояния антиоксидантной системы.

Витамины А и Е играют важную роль в метаболизме, характеризуются разносторонними физиологическими эффектами и биохимическим действием и являются низкомолекулярными антиоксидантами. Витамин А имеет особое значение в процессе восприятия света, необходим для нормального развития плода, а также влияет на процесс увеличения белой и бурой жировых тканей, имеющих важное значение для благополучной зимовки млекопитающих [10, 11]. Витамин Е в организме выполняет роль основного биологического антиоксиданта, является регулятором энергетического метаболизма [12]. Витамин Е обладает выраженным синергизмом с витамином А и предохраняет его от окисления.

Цель работы состояла в изучении содержания жирорастворимых витаминов А и Е в органах и тканях у рыжей полевки и обыкновенной бурозубки разного возраста. Содержание витаминов А и Е в тканях этих видов ранее практически не оценивалось.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили рыжая полевка (*Myodes (Clethrionomys) glareolus* Schreber, 1780) (n = 62) и обыкновенная бурозубка (*Sorex araneus* Linnaeus, 1758) (n = 38), которые были добыты в природных условиях в Республике Карелия (61–63° с. ш., 30–36° в. д.). Работу по отлову животных проводили на экспедиционной базе Института биологии КарНЦ РАН (Республика Карелия, Прямжинский район, деревня Каскеснаволок) с 2016 по 2022 гг. Весной отлов животных проводился с конца апреля и в мае, в летне-осенний период – с конца июля по ноябрь. Разрешения для отлова выданы Управлением охотничьего хозяйства Министерства сельского, рыбного и охотничьего хозяйства Республики Карелия. Животных отлавливали стандартными методами [13] в основных типах биотопов, используя стандартные ловушки (давилки) фабричного производства и ловчие канавки. Ловушки устанавливали линиями по 25 шт. с интервалом 5 м. Каждая линия работала 3 сут, с ежедневной однократной проверкой. Ловчие канавки длиной 30 м с тремя ловчими цилиндрами, на 1/3 заполненными водой, проверялись однократно в течение суток. Каждая канавка работала 5 сут. После отлова животных взвешивали, определяли возраст, пол и отбирали образцы тканей, которые замораживали до проведения анализа. Для определения возраста рыжих полевок использовался метод, разработанный Н.В. Тупиковой с соавт. [14], позволяющий по степени развития зубов устанавливать возраст зверька с точностью до двух месяцев. При отнесении зверька к той или иной возрастной группе дополнительно учитывались другие признаки – развитие тимуса, строение черепа, состояние репродуктивной системы и т. д. При делении прибылых зверьков на генерации использовался функционально-онтогенетический подход, который применялся и описан Э.В. Ивантером [6, 15] и Г.В. Оленевым [16, 17]. У землероек в качестве основных возрастных критериев использовали форму (конфигурация, состояние швов) черепа и степень стертости зубов, а в качестве вспомогательных – особенности снашивания волосяного покрова на хвосте, лапах и ушных раковинах [15]. В сомнительных случаях использовались также другие показатели, в частности, размер тимуса, который полностью инволюирует к осени первого года жизни и у перезимовавших зверьков практически не выражен.

Содержание витаминов А (ретинол) и Е (α-токоферол) определяли в печени, почках, сердце и скелетной мышце методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [18]. Образцы тканей (100 мг) гомогенизировали в 0,9 мл 0,25 М раствора сахарозы (pH 7,4) в качестве суспензирующей среды. К гомогенату добавляли 0,025%-ный раствор бутилгидрокситолуола в этиловом спирте и тщательно смешивали для осаждения белков. Приливали 0,0125%-ный раствор бутилгидрокситолуола в н-гексане, смесь встряхивали в течение 5 мин, затем центрифугировали при 3000g в течение 10 мин и выдерживали в течение 40 мин при 4°С. Пробу для хроматографического анализа отбирали из верхнего гексанового слоя, элюентом служила смесь гексана с изопропанолом в соотношении 98,5:1,5. Детектирование проводили при 292 нм для α-токоферола и 324 нм для ретинола. При построении калибровочных кривых использовали стандартные растворы ретинола и α-токоферола (Sigma-Aldrich, США).

Полученные данные обрабатывались с использованием пакетов программ MS Excel 2007 и Statgraphics 5.0. Для статистического анализа

применяли критерий Краскела-Уоллиса с последующим попарным сравнением с помощью критерия Манна-Уитни, использовали поправку на множественность сравнений. Данные на графиках представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Достоверных половых различий по исследуемым показателям не обнаружено, в связи с чем данные по самцам и самкам анализировали в совокупности.

Исследования выполнены с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты

Наиболее высокое содержание витамина А обнаружено в печени животных обоих видов (рис. 1). Уровень ретинола в почках рыжих полевок поздних генераций был значимо ниже по сравнению со зверьками ранних генераций и зимовавшими особями. У зимовавших бурозубок в почках и скелетной мышце установлено более высокое содержание витамина, чем у молодых животных. В печени зимовавших рыжих полевок содержание витамина А было значимо выше, чем у взрослых зимовавших бурозубок.

У рыжей полевки не было обнаружено достоверных возрастных различий в содержании витамина Е в тканях (рис. 2). У молодых особей бурозубки во всех тканях уровень витамина Е был значимо ниже, чем у взрослых животных. При этом в сердце, энергетический метаболизм которого очень высок, уровень витамина Е у сеголеток бурозубки был значимо ниже по сравнению как с взрослыми особями, так и с сеголетками рыжей полевки. В печени зимовавших особей бурозубки содержание витамина Е было значительно выше, чем у полевки.

Для контроля физиологического состояния определяли массу тела животных. У рыжей по-

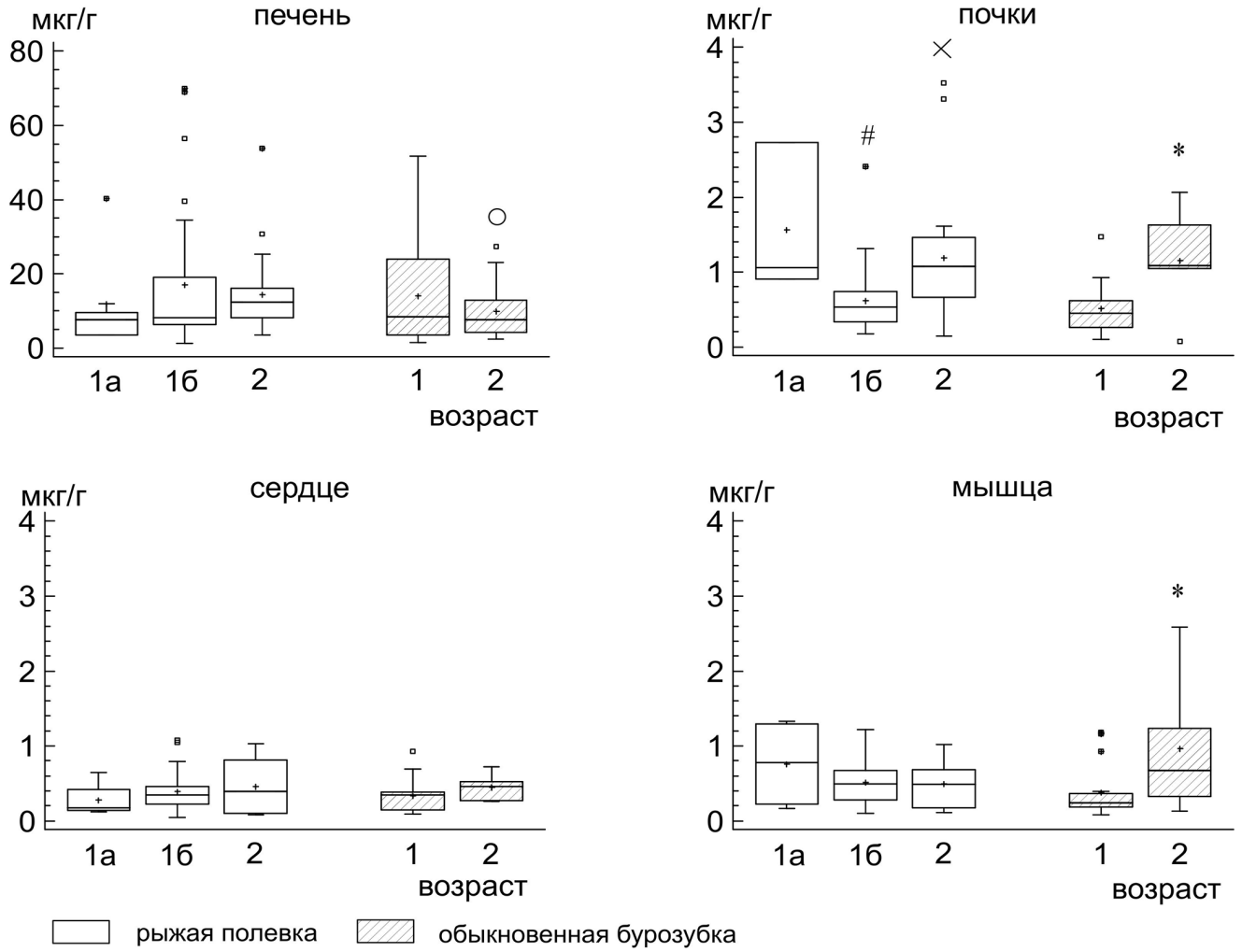


Рис. 1. Содержание витамина А в органах рыжей полевки и обыкновенной бурозубки.
Обозначения: (+) – среднее, (–) – медиана, □ – 25–75 %, I – статистический диапазон, ° – выпадающие варианты; 1 – сеголетки, 1а – сеголетки ранних генераций, 1б – сеголетки поздних генерации, 2 – зимовавшие животные. Различия достоверны по сравнению с: * – сеголетками, ○ – зимовавшими полевками, # – сеголетками ранних генераций, × – сеголетками поздних генераций ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом по Манну-Уитни).

левки средний вес зимовавших животных и сеголеток не имел достоверных различий (рис. 3). В то же время, сеголетки поздних генераций полевки имели более низкую массу тела по сравнению с ранними генерациями и взрослыми зимовавшими зверьками. У неполовозрелых особей бурозубки, отловленных в осенние месяцы, масса тела была ниже, чем у взрослых зимовавших животных.

Обсуждение результатов

Результаты исследования показали, что содержание витаминов А и Е в тканях рыжей полевки и обыкновенной бурозубки имеет высокую вариабельность, обусловленную значительными различиями в физиологическом состоянии обитающих в дикой природе животных, а также целым рядом факторов – биологической функцией органов, таксономической принадлежностью животных, уровнем и типом питания, возрастом, участием в размножении и т.д. Уровень ретинола и токоферола у исследованных видов в целом невысок по сравнению с более крупными представителями отрядов Rodentia и Eulipotyphla [19].

Содержание витаминов А и Е зависит от вида ткани, и у большинства млекопитающих наиболее высокий уровень витаминов обнаруживается в печени, откуда они транспортируются в другие органы. В нашем исследовании большее содержание витамина А у рыжей полевки и обыкновенной бурозубки также обнаружено в печени – в почках, сердечной и скелетной мышцах уровень ретинола был существенно ниже. У рыжих полевок поздних генераций в почках содержание ретинола было меньше, чем у весенне-летнего поколения зверьков. Грызунов разных сезонных генераций отличает целый комплекс морфофизиологических признаков: животные летне-осеннего рождения имеют низкий темп роста и развития, меньшую массу тела и упитанность по сравнению с полевками ранних генераций [20]. Выявленные различия, вероятно, не связаны с изменением общего уровня витамина А в организме, поскольку в печени, которая депонирует и регулирует его обмен, отличий между животными разных генераций обнаружено не было. Почки являются местом образования и удаления конечных продуктов обмена витамина А, избыток которого токсичен для организма. Более

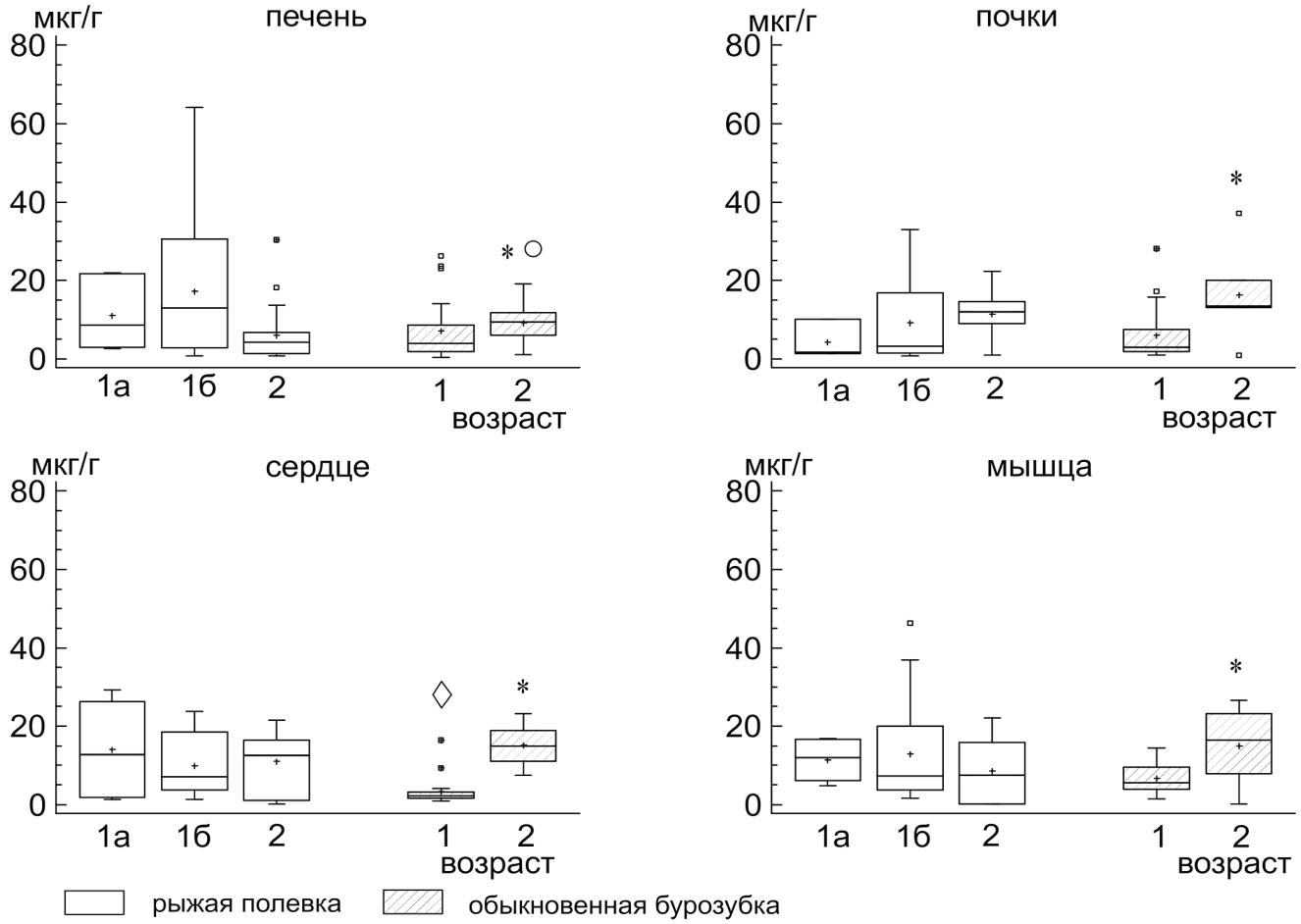


Рис. 2. Содержание витамина Е в органах рыжей полевки и обыкновенной бурозубки.
Обозначения: (+) – среднее, (–) – медиана, □ – 25–75 %, I – статистический диапазон, ° – выпадающие варианты; 1 – сеголетки, 1а – сеголетки ранних генераций, 1б – сеголетки поздних генерации, 2 – зимовавшие животные. Различия достоверны по сравнению с: * – сеголетками, ◊ – полевками сеголетками, ○ – зимовавшими полевками ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом по Манну-Уитни).

низкое содержание ретинола у животных летне-осеннего рождения связано, вероятно, со снижением у них выводящей функции органа в предзимний период. Следует отметить, что уровень витамина А в почках у сеголетков полевки поздних генераций также был ниже по сравнению с зимовавшими животными. Аналогичная разница наблюдалась в почках и скелетной мышце обыкновенной бурозубки. Известно, что для мелких млекопитающих характерно осеннее снижение массы тела и некоторых основных органов, что способствует успешной перезимовке [1–3, 6, 20, 21]. При этом у бурозубок эти изменения более выражены, чем у грызунов [2, 7, 20, 22, 23]. Весной происходит обратный процесс: увеличивается масса тела и внутренних органов, сопровождающееся накоплением питательных веществ, что направлено на подготовку к размножению, требующему больших энергетических затрат [2, 6]. Уровень ретинола в почках и скелетной мышце значительно ниже, чем в печени, однако эти ткани также являются местом хранения микронутриентов. У других видов мелких млекопитающих содержание витамина А исследовалось в основном в печени. Обнаружено, что у полевки-экономки его наиболее низкий уровень наблюдался у молодых особей зимой [24]. У красной и водяной полевок, ондатры и бурундука содержание витамина А у сеголетков было ниже по сравнению с взрослыми животными [25].

Общий уровень витамина А в печени пропорционален его количеству, поступающему с пищей, но эта зависимость не является линейной. При низком потреблении витамина А резервирование в печени низкое, так как большая часть поступающего в организм витамина используется для выполнения его биологических функций. В нашем исследовании у зимовавших животных более низкое содержание ретинола в печени выявлено у бурозубки по сравнению с рыжей полевкой. Обнаруженные различия могут быть связаны как с кормовой специализацией, так и с разным уровнем и особенностями обменных процессов у полевок и землероек. Установлено, что ретиноевая кислота, биологически активная форма витамина А, принимает участие в регуляции энергетического метаболизма, способствуя приобретению белыми адипоцитами свойств, характерных для бурой жировой ткани [26]. Финские исследователи считают, что обмен липидов более важен для землероек, чем для полевок. У зимующих бурозубок обнаружены значительные запасы жировой ткани, представленной преимущественно бурым жиром, который, как предполагают, играет роль белого жира у *Sorex araneus* [21, 27]. В зимний период у этого вида наблюдается самая высокая метаболическая активность бурой жировой ткани, направленная на поддержание термогенеза [28].

Печень является важным местом депонирования витамина Е, где происходит процесс его включения в состав липопротеинов, в комплексе с которыми токоферол доставляется кровью к другим органам и тканям. У зимующих мышевидных грызунов отмечается снижение массы тела, которая затем увеличивается с началом весеннего роста для обеспечения размножения животных, нормального течения беременности и лактации. Однако происходящие у животных сезонные физиологические перестройки не привели к значительным изменениям уровня витамина Е в тканях рыжих полевок. В то же время зимовавшие особи обыкновенной бурозубки во всех тканях имели более высокий уровень α-токоферола по сравнению с сеголетками. Известно, что метаболизм витамина Е в организме тесно связан с обменом липидов. По сравнению с рыжей полевкой, у обыкновенной бурозубки сезонные изменения количества бурой жировой ткани более выражены [29]. У бурозубок скорость обмена жира отрицательно коррелирует с размером тела [28]. Вероятно, в весенний период у зимовавших особей, масса тела которых была выше, чем у сеголетков, замедление процессов жирового обмена способствует повышению уровня α-токоферола в организме, несмотря на то, что для этого фенотипа характерно наиболее высокое потребление энергии [2]. Обнаруженные в сердечной и скелетной мышцах различия в содержании α-токоферола между сеголетками и зимовавшими бурозубками могут отражать в том числе и возрастные изменения в мышцах землероек [30]. Увеличение общего количества витамина Е в процессе старения, возможно, представляет адаптивную реакцию, связанную с доступностью токоферола для предотвращения окислительного повреждения тканей, которое увеличивается с возрастом [31].

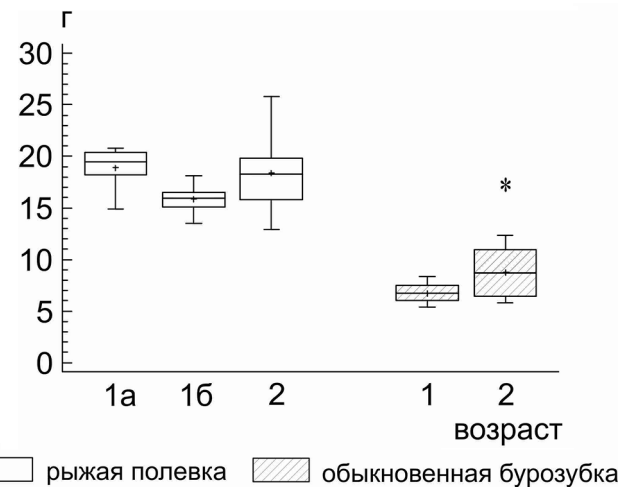


Рис. 3. Масса тела рыжей полевки и обыкновенной бурозубки. Обозначения: (+) – среднее, (–) – медиана, □ – 25–75 %, I – статистический диапазон, ° – выпадающие варианты; 1 – сеголетки, 1а – сеголетки ранних генераций, 1б – сеголетки поздних генерации, 2 – зимовавшие животные; * – различия достоверны по сравнению с сеголетками ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом по Манну-Уитни).

Содержание α-токоферола в печени зимовавших бурозубок было значительно выше, чем у зимовавших полевок. Исследования показывают, что метаболический потенциал разных тканей землеройки очень высок по сравнению с другими мелкими млекопитающими, в том числе грызунами [22, 32]. В то же время у отловленных осенью молодых бурозубок содержание α-токоферола в сердце, которое вместе с мозгом потребляет наибольшее количество энергии, было значительно ниже, чем у сеголетков рыжей полевки разных генераций. Причины сравнительно низкого уровня витамина Е в сердце бурозубок в осенний период требуют специальных исследований.

Таким образом, содержание витаминов А и Е в тканях рыжей полевки и обыкновенной бурозубки зависит от ряда факторов – видовых, физиологических, сезонных, трофических и др. У рыжей полевки дефинитивный уровень витаминов в органах и тканях формируется, вероятно, в раннем возрасте и в дальнейшем остается достаточно стабильным. Более выраженные возрастные изменения уровня витаминов в тканях обнаружены у бурозубки и связаны, очевидно, с сезонными изменениями метаболизма и экологическими особенностями вида. Присущие разным видам животных эколого-физиологические черты определяют адаптивный потенциал вида и влияют на возрастные особенности содержания витаминов в органах и тканях. Выявленный у рыжей полевки и обыкновенной бурозубки на разных этапах онтогенеза уровень витаминов А и Е можно считать фактором биохимического гомеостаза, обусловленным различием в уровне обменных процессов у разных видов мелких млекопитающих. Высокая устойчивость обитающих на севере млекопитающих к действию условий среды не ограничивается только морфологическими или физиологическими изменениями, но также поддерживается с помощью биохимических адаптаций.

Заключение

В результате исследования установлено содержание витаминов А и Е в органах рыжей полевки и обыкновенной бурозубки. Несмотря на то, что исследуемые виды относятся к разным отрядам, распределение витамина А в тканях было схожим, при этом наибольшее содержание ретинола наблюдалось в печени, а наименьшее – в сердце. У обоих видов выявлены возрастные различия по уровню ретинола в почках. Бурозубки разного возраста различались по содержанию витамина А в скелетной мышце. Возрастные изменения содержания витамина Е в тканях рыжей полевки и обыкновенной бурозубки имели различный характер. У зимовавших особей бурозубки установлено более высокое содержание токоферола в тканях по сравнению с сеголетками накануне зимовки, в то время как у рыжей полевки возрастных различий не обнаружено. В целом проведенное сравнительное исследование показывает специфический профиль витаминов в органах исследованных видов. Выявленные межвидовые различия содержания витаминов А и Е в тканях рыжей полевки и обыкновенной бурозубки являются, вероятно, отражением эволюционно сложившихся взаимоотношений между организмом и средой обитания, при которых обеспечивается наиболее эффективное функционирование метаболических систем организма у мелких млекопитающих из разных экологических групп на северной периферии их ареала.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания – тема № FMEN-2022-0003. Работа выполнена в соответствии с этическими стандартами, утвержденным правовыми актами РФ, принципами Базельской декларации и рекомендациями этического комитета Института биологии КарНЦ РАН (протокол № 3 от 14 августа 2023 года). Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сафронов В.М. Адаптивные особенности терморегуляции и поддержания энергетического баланса у мышевидных грызунов. *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология*. 2009;4(8):47–61.

2. Schaeffer P.J., O'Mara M.T., Breiholz J., Keicher L., Lázaro J., Muturi M., Dechmann D.K.N. Metabolic rate in common shrews is unaffected by temperature, leading to lower energetic costs through seasonal size reduction. *R. Soc. Open Sci.* 2020;7(4):191989.

3. Gliwicz J., Taylor J.R.E. Comparing life histories of shrews and rodents. *Acta Theriol.* 2002;47(1):185–208.

4. Rogovin K.A., Bushuev A.V., Khruscheva A.M., Vasilieva N.Y. Resting metabolic rate, stress, testosterone, and induced immune response in spring-and fall-born males of Campbell's dwarf hamsters: maintenance in long-day conditions. *Biol. Bull. Rev.* 2014;4(3):181–191.

5. Башенина Н.В. *Пути адаптаций мышевидных грызунов*. М.: Наука; 1977. 355 с.

6. Ивантер Э.В. *Очерки популяционной экологии мелких млекопитающих на северной периферии ареала*. М.: Тов-во науч. изд. КМК; 2018. 770 с.

7. Tarakhtii E.A., Davydova Yu.A. Seasonal variation in hematological indices in bank vole (*Clethrionomys glareolus*) in different reproductive states. *Biol. Bull.* 2007; 34(1):9–19.

8. Новиков Е.А., Кондратюк Е.Ю., Петровский Д.В. Влияние типа онтогенеза на биоэнергетические показатели красной полевки (*Myodes rutilus* Pall) из горно-таежной популяции юга Западной Сибири. *Экология*. 2015;(5):387–391.

9. Campbell K.L., Signore A.V., Harada M., Weber R.E. Molecular and physicochemical characterization of

hemoglobin from the high-altitude Taiwanese brown-toothed shrew (*Episoriculus fumidus*). *J. Comp. Physiol. B.* 2012;182(6):821–829.

10. Ribot J., Felipe F., Bonet M.L., Palou A. Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPARγ2 expression. *Obes. Res.* 2001;9(8):500–509.

11. Sprenger R.J., Tanumihardjo S.A., Kurtz C.C. Developing a model of vitamin A deficiency in a hibernating mammal, the 13-lined ground squirrel (*Ictidomys tridecemlineatus*). *Compar. Med.* 2018;68(3):196–203.

12. Калабухов Н.И. *Спячка млекопитающих.* М.: Наука; 1985. 260 с.

13. Карасева Е.В., Телицына А.Ю., Жигальский О.А. *Методы изучения грызунов в полевых условиях.* М.: Изд-во ЛКИ; 2008. 416 с.

14. Тупикова Н.В., Сидорова Г.А., Коновалова Э.Ф. *Определение возраста лесных полевок. Фауна и экология грызунов.* М.: Изд-во МГУ; 1970:160–167.

15. Ивантер Э.В. *Популяционная экология мелких млекопитающих таежного Северо-Запада СССР.* Л.: Наука. 1975. 246 с.

16. Оленев Г.В. Альтернативные типы онтогенеза цикломорфных грызунов и их роль в популяционной динамике (экологический анализ). *Экология.* 2002;(5):341–350.

17. Оленев Г.В. Определение возраста цикломорфных грызунов, функционально-онтогенетическая детерминированность, экологические аспекты. *Экология.* 2009;(2):103–115.

18. Скурихин В.Н., Двинская Л.М. Определение α-токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Сельскохозяйственная биология.* 1989;4:127–129.

19. Ильина Т.Н., Илюха В.А., Баишникова И.В., Белкин В.В., Сергина С.Н., Антонова Е.П. Система антиоксидантной защиты в тканях полуводных млекопитающих. *Ж. эволюц. биохим. физиол.* 2017;53(4):251–256.

20. Ивантер Э.В. Опыт экологического анализа морфофизиологических особенностей мелких млекопитающих. *Ученые записки Петрозаводского университета.* 2018;8(177):7–16.

21. Nieminen P., Hyvärinen H. Seasonality of leptin levels in the BAT of the common shrew (*Sorex araneus*). *Z. Naturforsch C. J. Biosci.* 2000;55(5–6):455–460.

22. Ивантер Э.В., Ивантер Т.В., Туманов И.Л. *Адаптивные особенности мелких млекопитающих: Эколого-морфологические и физиологические аспекты.* Л.: Наука; 1985. 318 с.

23. Kiselev S.V. Interannual variability in the energy reserves of Laxmann's shrew (*Sorex caecutiens*) on the northern coast of the sea of Okhotsk. *Biol. Bull.* 2022;49(2):107–116.

24. Соломонов Н.Г., Попов М.В. Эколого-физиологические и морфологические адаптации якутских млекопитающих к зимним условиям. *Адаптация животных к зимним условиям.* Под ред. В.Е Соколова. М.: Наука; 1980:109–116.

25. Мордосов И.И., Прокопьев Н.П. *Популяционная экология грызунов Лено-Вилюйского междуречья.* Якутск: Изд. дом СВФУ; 2021. 264 с.

26. Mercader J., Ribot J., Murano I., Felipe F., Cinti S., Bonet M.L., Palou A. Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology.* 2006;147(11):5325–5332.

27. Hyvärinen H. Brown fat and the wintering of shrews. *Advances in the biology of shrews. Carnegie Mus. Nat. Hist. Spec., vol 18.* Eds. J.F. Merritt, G.L. Kirkland, Jr., and R.K. Rose. Pittsburgh: 1994:259–266.

28. Keicher L., O'Mara M.T., Voigt C.C., Dechmann D.K. Stable carbon isotopes in breath reveal fast metabolic incorporation rates and seasonally variable but rapid fat turnover in the common shrew (*Sorex araneus*). *J. Exp. Biol.* 2017;220(15):2834–2841.

29. Hissa R., Tarkkonen H. Seasonal variations in brown adipose tissue in two species of voles and the common shrew. *Ann. Zool. Fenn.* 1969;6:444–447.

30. Hindle A.G, Lawler J.M, Campbell K. L, Horning M. Muscle senescence in short-lived wild mammals, the soricine shrews *Blarina brevicauda* and *Sorex palustris*. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 2009;311(5):358–367.

31. Hollander D., Dadufalza V. Lymphatic and portal absorption of vitamin E in aging rats. *Dig. Dis. Sci.* 1989;34(5):768–772.

32. Stewart J.M., Woods A.K., Blakely J.A. Maximal enzyme activities, and myoglobin and glutathione concentrations in heart, liver and skeletal muscle of the Northern Short-tailed shrew (*Blarina brevicauda*; Insectivora: Soricidae). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2005;141(3):267–273.

Поступила в редакцию 05.09.2023
После доработки 12.04.2024
Принята в печать 17.04.2024

RESEARCH ARTICLE

Vitamins A and E content in the tissues of the bank vole (*Myodes* (*Clethrionomys*) *glareolus*) and common shrew (*Sorex araneus*) inhabiting in Karelia

T.N. Ilyina, I.V. Baishnikova*, A.E. Yakimova, I.A. Zaitseva

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya str., 11, Petrozavodsk, 185910, Russia
**e-mail: iravbai@mail.ru*

We studied the vitamins A (retinol) and E (α-tocopherol) content in the tissues of the bank vole (*Myodes* (*Clethrionomys) glareolus*) and common shrew (*Sorex araneus*) inhabiting the northern periphery of its range. The distribution of vitamin A in the common shrew and bank vole tissues

was similar, the highest content was found in the liver, and the lowest level was in the heart. Age-related differences in retinol content were detected in the kidneys of two species, as well as in the skeletal muscle of the shrew. Significantly lower vitamin E content was found in all organs of young shrews before wintering, compared to adult wintered animals, while in the bank vole no such age-related differences were found. Interspecies differences in the levels of vitamins A and E in the liver of overwintered animals were revealed. The results obtained show that vitamins A and E content in the tissues of the bank vole and the common shrew is determined by the metabolic processes and the ecological characteristics of the species. The vitamins level in the common shrew depends largely on age.

Keywords*: vitamin A, vitamin E, metabolism, age, season, mammals*

Funding: This study was carried out under state order (project № FMEN-2022-0003).

Сведения об авторах

Ильина Татьяна Николаевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории экологической физиологии животных Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-8142-57-31-07; e-mail: ilyinatn59@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8708-7775

Башникова Ирина Валерьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории экологической физиологии животных Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-8142-57-31-07; e-mail: iravbai@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5064-3731

Якимова Алина Евгеньевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории зоологии животных Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-8142-57-31-40; e-mail: angelina73@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9196-1808

Зайцева Ирина Алексеевна – ведущий биолог лаборатории экологической физиологии животных Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-8142-573107; e-mail: ira.irmita@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6277-009X

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, затрагивают самые разные разделы современной биологии, но обязательно в фундаментальном аспекте. К печати принимаются только комплексные работы, представляющие собой завершенные исследования или проблемные теоретические обзоры.

«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией «Pleiades Publishing Group» на английском языке под названием «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Оба издания синхронны и выходят четыре раза в год. Русская версия журнала индексируется в базах данных РИНЦ, ВИНИТИ, EastView, RSCI на платформе Web of Science, английская – в Scopus, SCImago, EBSCO Discovery Service, OCLC WorldCat Discovery Service, ProQuest Central, AGRICOLA, EMBiology, Institute of Scientific and Technical Information of China, Japanese Science and Technology Agency (JST), Dimensions, Google Scholar и др. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ русскоязычной версии в 2022 г. составляет 0,875, показатель CiteScore 2022 (Scopus) англоязычной версии – 0,9.

После принятия статьи в печать редакция высылает авторам договоры с издателем журнала, которые необходимо заполнить и подписать всем соавторам. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Заполненные и подписанные договоры можно присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присылать в наш журнал свои статьи, если они написаны на литературном русском языке и оформлены в соответствии с настоящими Правилами.

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подтверждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc) и Word 2007 (*.docx), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько – по фамилии первого (например, Иванов и др.doc). Форматирование: шрифт Times New Roman, кегль 12, междустрочный интервал – полуторный, отступ – 1,25, выравнивание по ширине (для удобства к правилам прилагается шаблон статьи). Редакция рекомендует придерживаться следующего объема рукописи: до 4000 слов для экспериментальной статьи, до 7000 слов для обзорной (включая список литературы и резюме на английском языке). Объёмы, значительно отклоняющиеся от рекомендованных, необходимо согласовывать с редакцией.

На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы (полужирным шрифтом, кегль 14), инициалы и фамилии авторов (полужирным шрифтом), наименование организации с указанием почтового адреса (курсивом), в сноске на первой странице указывается e-mail автора (отмеченного в заголовке звездочкой), ответственного за переписку с редакцией. После информации о местах работы следуют резюме статьи на русском языке (150–300 слов) и ключевые слова (6–7 слов или словосочетаний, курсивом).

Образец оформления «шапки» статьи:

УДК 577.29

Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера

Н.А. Стефанова[1], Н.Г. Колосова[1,2,*]

[1] Сектор молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской академии наук, Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10;

[2] кафедра цитологии и генетики, биологическое отделение, Новосибирский государственный университет, Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

[*] e-mail: kolosova@mail.ru

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как «результаты и обсуждение»), заключение, список литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным шрифтом), слова «список литературы» набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение – нижний колонтитул, середина страницы).

Информация о финансировании работы приводится перед списком литературы в следующей формулировке:

«Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 00-00-00000)».

Кроме того, также перед списком литературы авторы должны сообщить о наличии или отсутствии конфликта интересов и указать, каким этическим советом утверждены протоколы исследования, если эксперименты проводились с использованием животных или с привлечением людей в качестве испытуемых.

После списка литературы размещается фраза «Поступила в редакцию...», где указывается дата отправки рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в «шапке» статьи).

Образец оформления англоязычной «шапки» статьи:

Evolution of understanding of Alzheimer's disease pathogenesis

N.A. Stefanova[1], N.G. Kolosova[1,2,*]

[1] Sector of Molecular Mechanisms of Aging, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentyeva pr. 10, Novosibirsk, 630090, Russia;

[2] Chair of Cytology and Genetics, Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Pirogova ul. 2, Novosibirsk, 630090, Russia

[*] e-mail: kolosova@mail.ru

После ключевых слов приводится информация о финансировании работы (Funding) на английском языке:

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 00-00-00000. (This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number AAAA-A00-000000000000-0).

На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью (курсивом), научная степень, должность, место работы, рабочий телефон (с кодами страны и города), e-mail.

Образец:

Иванов Иван Иванович – канд. (докт.) биол. (мед.) наук, ст. (мл.) науч. сотр., (доц., проф.) кафедры..... биологического факультета МГУ. Тел.:8-495-939-..-..; e-mail:...

Таблицы и рисунки

Число таблиц и рисунков не должно быть избыточным (рекомендуется приводить не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах, предпочтение отдается рисункам. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи (после сведений об авторах). Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово «рисунок» («таблица») при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово «рис» и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное реальное (не интерполированное!) разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Иллюстрации могут быть цветными, однако необходимо учитывать, что цвет будет сохранен лишь в электронной версии статьи, но не в печатной. В связи с этим необходимо подобрать цвета таким образом, чтобы при переводе рисунка в оттенки серого его смысл не терялся и все элементы были различимы.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

Список литературы

Список литературы оформляется в соответствии с форматом Vancouver. Указатель литературы к статьям формируется в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту. Мы рекомендуем авторам придерживаться осмысленного соотношения объемов текста статьи и пристатейного списка литературы. Как правило, список литературы должен занимать от 20 до 40% общего объема рукописи.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные статьи, в основном – напечатанные в последнее десятилетие (в некоторых областях биологии допустимы отклонения от этого правила, которые необходимо согласовывать с редакцией). Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, «...что соответствует выводам Смита [19]».

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

1) **Статья в журнале.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи. *Название журнала* (принятый сокращенный вариант). Год;том(номер):страницы.

2) **Книга.** Авторы (инициалы после фамилии). *Название книги*. Город: Название издательства (без кавычек); год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи. *Название сборника*. Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия (если редактора два, то между ними ставится и/and). Город: Название издательства (без кавычек); год:страницы.

4) **Электронный ресурс.** *Название сайта* [Электронный ресурс]. Год. Дата обновления (если есть): дд.мм.гггг. URL: htpp://www... (дата обращения: дд.мм.гггг). [Дата обращения – это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана].

5) **Электронная публикация.** Авторы (инициалы после фамилии). Название публикации [Электронный ресурс]. *Название источника*. Год. URL: htpp://www... (дата обращения: дд.мм.гггг).

Если авторов больше 15, то приводятся только фамилии и инициалы первых трех (*Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.*; *Smith A., Jones J., Brown R., et al.*). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП – Бюл. МОИП, Journal of Biochemistry – J. Biochem. и т.п.), то же касается и городов (Москва – М., New York – N.Y. и т.д.). Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию только в том случае, если статья не издавалась в бумажном виде.

Примеры оформления источников в списке литературы:

Статья в журнале:

Litchfield K., Reading J.L., Puttick C., Thakkar K., Abbosh C., Bentham R., Watkins T.B., Rosenthal R., Biswas D., Rowan A., Lim E. Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition. *Cell*. 2021;184(3):596–614.

Marchena M., Echebarria B. Influence of the tubular network on the characteristics of calcium transients in cardiac myocytes. *PloS One*. 2020;15(4):e0231056.

Гребенкин И.В., Алексеенко А.Е., Гайворонский Н.А., Игнатов М.Г., Казённов А.М., Козаков Д.В., Кулагин А.П., Холодов Я.А. Применение ансамбля нейросетей и методов статистической механики для предсказания связывания пептида с главным комплексом гистосовместимости. *Комп. исслед. моделир*. 2020;12(6):1383–1395.

Книга:

Holliday R. *Aging: the paradox of life: why we age*. Dordrecht: Springer; 2007. 132 pp.

Рязанова Г.И. *Поведение насекомых*. М.: Изд-во Моск. ун-та; 2019. 232 с.

Статья в сборнике:

Mahajan M., Yadav R.K. Labeling and sorting of Arabidopsis SAM cell populations to capture their transcriptome profile. *Plant Stem Cells: Methods and Protocols, vol. 2094*. Eds. M. Naseem and T. Dandekar. N.Y.: Humana; 2020:39–47.

Храмченкова О.М., Бачура Ю.М. Альгодиагностика деградированных почв. *Радиация, экология и техносфера: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 26–27 сент. 2013 г.)*. Под ред. А.Д. Наумова. Минск: Ин-т Радиологии; 2013:174–176.

Электронный ресурс:

Senescence.info [Электронный ресурс]. 1997. Дата обновления: 18.08.1989. URL: http://www.senescence.info (дата обращения: 11.03.2021).

Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: htpp://www.unesco.org (дата обращения: 15.02.2021).

Электронная публикация:

Bizzarro J.J. Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс]. *IUCN Red List of Threatened Species*. 2009. URL: htpp://www.iucnredlist.org (дата обращения: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

Дополнительные правила оформления

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м – метр, кг – килограмм, мин – минута, ° – градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия – NaCl, углекислый газ – CO_2 и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота – АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота – ДНК, аргинин – Арг, валин – Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов – обычным шрифтом. Например: ген – *FOXO3,* его продукт – FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно

пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвидовые названия.

Например: ... два вида кузнечиков подсемейства мечников (Tettigoniidae, Conocephalinae): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.)...

Подготовка к печати

Рукопись, присланная автором, проверяется редколлегией на соответствие профилю и правилам оформления журнала. На первичное рассмотрение отводится 7–10 дней. Если в оформлении статьи обнаруживаются ошибки, ее рассмотрение занимает больше времени, так как редакторам необходимо составить список недочетов. Если работа совсем не соответствует требованиям, она возвращается авторам без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. Рецензирование занимает от двух недель до месяца. Срок рецензирования включает в себя не только непосредственную работу рецензентов с рукописью, но и поиск подходящих специалистов (поиск может занять от двух дней до двух недель). После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 7 дней, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Возможно несколько раундов рецензирования, если у рецензентов возникают новые замечания или они не согласны с исправлениями и ответами авторов. Далее над рукописью работают редакторы, исправленный текст и замечания отсылаются авторам на 2–3 рабочих дня.

Корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам также на 2–3 рабочих дня, в течение которых необходимо тщательно проверить текст, рисунки, таблицы и т.д., внеся в гранки необходимую правку. В случае англоязычной корректуры желательно уделить особое внимание специальным терминам, которые могут быть неправильно интерпретированы переводчиками. Приветствуется практика публикации в английской версии авторских переводов статей.

Важно: если авторы подают статью, написанную на английском языке в русскоязычную версию журнала, она публикуется только в этой версии и не публикуется в переводной версии (Moscow University Biological Science Bulletin). Для подачи статьи в переводную версию, необходимо воспользоваться системой сайта Pleiades Publishing (https://www.pleiades.online/ru/journal/bbscimgu/).

Полезные ссылки

Список сокращенных названий журналов можно найти здесь

Классификатор УДК располагается здесь

О том, как правильно сокращать общепринятые термины, можно прочитать здесь