

Включен в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней по научным специальностям:

1.5.9. Ботаника, 1.5.11. Микробиология, 1.5.12. Зоология, 1.5.7. Генетика, 1.5.18. Микология, 3.2.7. Аллергология и иммунология (биологические и медицинские науки), **3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика**

Учредитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

Редакционный совет

В. С. Артамонова, д.б.н., Институт почвоведения и агрохимии СО РАН, г. Новосибирск, Россия
О. Ю. Баранов, д.б.н., Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель, Беларусь
О. Г. Баранова, д.б.н., Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. С.-Петербург, Россия
В. Д. Богданов, д.б.н., чл.-корр. РАН, Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия
М. В. Винарский, д.б.н., Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия
О. В. Долгих, д.м.н., Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения Роспотребнадзора, г. Пермь, Россия
С. А. Заморина, д.б.н., Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия
Е. В. Зиновьев, д.м.н., Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия
Р. А. Календарь, к.б.н., "National Laboratory Astana", Назарбаев Университет, г. Нур-Султан, Республика Казахстан
Э. А. Коркотян, к.б.н., Научно-исследовательский институт им. Вейцмана, г. Реховот, Израиль
Н. Кристофи, PhD, Эдинбургский Нэпир университет, г. Эдинбург, Великобритания
А. И. Литвиненко, д.б.н., Государственный аграрный университет Северного Зауралья, г. Тюмень, Россия
П. Б. Михеев, PhD, доцент, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия
Е. Г. Плотникова, д.б.н., Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия
Д. В. Политов, д.б.н., Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва, Россия
А. В. Пузанов, д.б.н., Институт водных и экологических проблем СО РАН, г. Барнаул, Россия
М. Б. Раев, д.б.н., Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия
Е. В. Рахимова, д.б.н., Институт ботаники и фитоинтродукции Комитета лесного хозяйства и животного мира, г. Алматы, Республика Казахстан
В. А. Черешнев, д.м.н., академик РАН, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия
А. Г. Ширяев, д.б.н., Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

Редакционная коллегия

С. В. Боронникова, д.б.н., Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия
С. В. Гейн, д.м.н., Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия
А. А. Елькин, к.б.н., Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия
О. З. Еремченко, д.б.н., Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия
С. Л. Есюнин, д.б.н., Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия
Е. Г. Ефимик (секретарь редколлегии), к.б.н., Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия
Н. В. Зайцева, д.м.н., академик РАН, Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения Роспотребнадзора, г. Пермь, Россия
И. Б. Ившина, д.б.н., академик РАН, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия
А. Р. Ишбирдин, д.б.н., профессор, Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия
М. С. Куюкина (гл. редактор), д.б.н., Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия
С. А. Овеснов, д.б.н., Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия
Л. Г. Переведенцева, д.б.н., Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия
О. Ю. Устинова, д.м.н., Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения Роспотребнадзора, г. Пермь, Россия

Ответственный редактор выпуска *С. А. Овеснов*

© Редакционная коллегия, 2023

Адрес учредителя и издателя:
614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15;
Тел.: 8 (342)2396435; E-mail: info@psu.ru
Подписка на журнал осуществляется онлайн на сайте агентства «Урал-Пресс»
<https://www.ural-press.ru/catalog/97266/8940022/>. Подписной индекс 41000
Адрес редакции: 614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15;
Тел.: 8 (342)2396233
E-mail: vestnik_psu_bio@mail.ru
Сайт: press.psu.ru/index.php/bio

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свид. о регистрации средства масс. информации ПИ № ФС 77-66484 от 14 июля 2016 г.

Editorial Board

- V. S. Artamonova*, Dr. Biol. Sc., Institute of Soil Science and Agrochemistry of the SB RAS, Novosibirsk, Russia
O. Yu. Baranov, Dr. Biol. Sc., Institute of Forest of the NAS of Belarus, Gomel, Belarus
O. G. Baranova, Dr. Biol. Sc., Botanical Institute of the RAS, St. Petersburg, Russia
V. D. Bogdanov, Dr. Biol. Sc., Corresponding Member of the RAS, Institute of Plant and Animal Ecology of UB RAS, Ekaterinburg, Russia
M. V. Vinarski, Dr. Biol. Sc., St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia
O. V. Dolgikh, Dr. Med. Sc., Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russia
S. A. Zamorina, Dr. Biol. Sc., Perm State University, Perm, Russia
E. V. Zinoviev, Dr. Med. Sc., Institute of Plant and Animal Ecology of UB RAS, Ekaterinburg, Russia
R. A. Kalendar, Cand. Biol. Sc. "National Laboratory Astana", Nazarbaev University, Nur-Sultan, Kazakhstan
E. A. Korkotyan, Cand. Biol. Sc. Weizmann Institute of Science, Rehovot, Izrael
N. Christofi, PhD, Edinburgh Napier University, Edinburgh, Great Britain
A. I. Litvinenko, Dr. Biol. Sc., State agrarian University of Northern TRANS-Urals, Tyumen, Russia
P. B. Mikheev, PhD, Perm State University, Perm, Russia
E. G. Plotnikova, Dr. Biol. Sc., Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB RAS, Perm, Russia
D. V. Polotov, Dr. Biol. Sc., Vavilov Institute of General Genetics of the RAS, Moscow, Russia
A. V. Puzanov, Dr. Biol. Sc., Institute for Water and Environmental Problems of the SB RAS, Barnaul, Russia
M. B. Raev, Dr. Biol. Sc., Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB RAS, Perm, Russia
E. V. Rachimova, Dr. Biol. Sc., Institute of Botany and Phytointroduction of the Committee for Forestry and Wildlife, Almaty, Kazakhstan
V. A. Chereshev, Dr. Med. Sc., Full Member of the RAS, Institute of Immunology and Physiology of UB RAS, Ekaterinburg, Russia
A. G. Shiryayev, Dr. Biol. Sc., Institute of Plant and Animal Ecology of the UB RAS, Ekaterinburg, Russia

Editors

- S. V. Boronnikova*, Dr. Biol. Sc., Perm State University, Perm, Russia
S. V. Gein, Dr. Med. Sc., Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB RAS, Perm, Russia
A. A. Elkin, Cand. Biol. Sc., Perm State University, Perm, Russia
O. Z. Eremchenko, Dr. Biol. Sc., Perm State University, Perm, Russia
S. L. Esyunin, Dr. Biol. Sc., Perm State University, Perm, Russia
E. G. Efimik (secretary of the editorial board), Cand. Biol. Sc., Perm State University, Perm, Russia
N. V. Zaitseva, Dr. Med. Sc., Full Member of the RAS, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russia
I. B. Ivshina, Dr. Biol. Sc., Full Member of the RAS, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB RAS, Perm, Russia
A. R. Ishbirdin, Dr. Biol. Sc., Bashkir State University, Ufa, Russia
M. S. Kuyukina (editor in chief), Dr. Biol. Sc., Perm State University, Perm, Russia
S. A. Ovesnov, Dr. Biol. Sc., Perm State University, Perm, Russia
L. G. Perevedenceva, Dr. Biol. Sc., Perm State University, Perm, Russia
O. Yu. Ustinova, Dr. Med. Sc., Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russia

Contributed editor of the issue *S. A. Ovesnov*

© Editorial Board, 2023

Founder and Publisher Address:
614068, Perm, Bukireva, 15;
Tel: 8 (342) 2396435; E-mail: info@psu.ru
For subscription, visit the catalog of Ural-Press: <https://www.ural-press.ru/catalog/97266/8940022/>. Index 41000

The journal is registered with the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration of mass media PI No. FS 77-66484 dated July 14, 2016.

Editorial office address: 614068, Perm, Bukireva, 15;
Tel.: 8 (342) 2396233
E-mail: vestnik_psu_bio@mail.ru
Website: press.psu.ru/index.php/bio

Содержание

Зоология

- Дьячков Ю. В.* История изучения и предварительные данные по Chilopoda Приморского края, Дальний Восток России 307
- Семенов В. В.* Белая и тундряная куропатки в заповеднике «Басеги». Виды на южной границе ареала 315
- Фарзалиева Г. Ш., Овчанкова Н. Б., Дьячков Ю. В.* Первая находка *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1958) (Chilopoda: Scutigermorpha, Scutigeridae) в Пермском Крае (Средний Урал) 323

Микробиология

- Бажутин Г. А., Тюмина Е. А., Селянинов А. А., Вихарева Е. В.* Интенсификация процесса биодеструкции ибупрофена с использованием факторного анализа и кинетического моделирования . 328
- Баяндина Е. А., Поздеева А. П., Куюкина М. С., Ившина И. Б.* Устойчивость коллекционных штаммов родококков к воздействию экотоксиканта – этоксилированного нонилфенола 337
- Корсакова Е. С., Пьянкова А. А., Плотникова Е. Г.* Бактерии-деструкторы дибутилфталата, выделенные из ризосферы мятлика лугового (*Poa pratensis* L.) 349
- Сидоров Р. Ю., Ткаченко А. Г.* Алармоны как фактор персистенции бактерий 356
- Триандафилова Г. А., Тюленев А. В., Музыка Н. Г., Смирнова Г. В., Октябрьский О. Н.* Влияние оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов CBR-384 и CBR-386 на дыхательную активность и уровень внеклеточных серосодержащих соединений у бактерий *Escherichia coli* . . 367

Генетика

- Сбоева Я. В.* Оценка состояния генофондов популяций *Pinus sylvestris* L. на востоке и северо-востоке Восточно-Европейской равнины 375
- Сорокина А. В., Боронникова С. В.* Молекулярно-генетический анализ генов *ADRB2*, *NOS3* и *PPARGC1A* у единоборцев города Перми 385

Экология

- М. Л. Отавина, И. В. Батенкова, И. Н. Гаврилова, В. В. Горбунова, Н. В. Огарышева*
Морфофункциональный статус студентов-первокурсников смежных поколений на рубеже веков 394

Иммунология

- Орлова Е. Г., Логинова О. А., Горбунова О. Л., Ширшев С. В.* Галектин-9 как модулятор функциональной активности натуральных киллеров при беременности 403

Contents

Zoology

- Dyachkov Yu. V.* [Fauna and history of the studies of Chilopoda from the Maritime Province, Russian Far East 307
- Semenov V. V.* White and tundra partridges in the Basegi Nature Reserve. Species on the southern border of the range 315
- Farzaliyeva G. Sh., Ovchankova N. B., Dyachkov Yu. V.* The first record of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1958) (Chilopoda: Scutigermorpha, Scutigeridae) in the Perm Krai (Middle Urals) 323

Microbiology

- Bazhutin G. A., Tyumina E. A., Selyaninov A. A., Vihareva E. V.* Enhancing the biodegradation of ibuprofen through factor analysis and kinetic modeling 328
- Bayandina E. A., Pozdeeva A. V., Kuyukina M. S., Ivshina I. B.* Resistance of collection strains of *Rhodococcus* to the effects of ecotoxicant – ethoxylated nonylphenol 337
- Korsakova E. S., Pyankova A. A., Plotnikova E. G.* Dibutyl phthalate degrading bacteria isolated from the rhizosphere of bluegrass (*Poa pratensis* L.) 349
- Sidorov R. Yu., Tkachenko A. G.* Alarmones as bacterial persistence factor 356
- Triandafilova G. A., Tyulenev A. V., Muzyka N. G., Smirnova G. V., Oktyabrsky O. N.* Influence of oxo-derivatives of nitrogen containing heterocycles CBR-384 and CBR-386 on respiratory activity and the level of extracellular sulfur containing compounds in *Escherichia coli* 367

Genetics

- Sboeva Ya. V.* Assessment of the state of gene pools of *Pinus sylvestris* L. populations in the east and northeast of the East European Plain 375
- Sorokina A. V., Boronnikova S. V.* Molecular genetic analysis of *ADRB2*, *NOS3* and *PPARGCIA* genes in martial artists of the city of Perm 385

Ecology

- Otavina M. L., Batenkova I. V., Gavrilova I. N., Gorbunova V. V., Ogarysheva N. V.* Morphofunctional status of first-year students of adjacent generations at the turn of the millennium 394

Immunology

- Orlova E. G., Loginova O. A., Gorbunova O. L., Shirshov S. V.* Galectin-9/Tim-3-dependent mechanism of regulation of functional activity of natural killers during pregnancy 403

ЗООЛОГИЯ

Обзорная статья

УДК 595.62

doi: 10.17072/1994-9952-2023-4-307-314

История изучения и предварительные данные по Chilopoda Приморского края, Дальний Восток России

Юрий Вячеславович Дьячков

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия, dyachkov793@mail.ru

Аннотация. Приводятся история изучения и список видов губоногих многоножек Приморского края. Первые сведения о представителях данной фауны датируются концом XIX в., более активные исследования начались лишь во второй половине следующего столетия. На сегодняшний день рассматриваемая фауна представлена 31 видом из 12 родов, 7 семейств и 4 отрядов. Семь видов (*Agnostrup striganovae* (Titova, 1975), *Arrup mamaevi* (Titova, 1975), *Escaryus dentatus* Titova, 1973, *E. krivolutskiji* Titova, 1973, *E. polygonatus* Titova, 1973, *Lithobius fissuratus* Attems, 1934 и *L. kurchevae* (Zalesskaja, 1978)) известны только из рассматриваемого региона. Таксономический статус следующих видов требует современной оценки: *Arctogeophilus sachalinus* Verhoeff, 1934, *Geophilus sounkyoensis* Takakuwa, 1937, *Strigamia hirsutipes* (Attems, 1927), *S. cf. transsilvanica* (Verhoeff, 1928), *Arrup mamaevi*, *Escaryus dentatus*, *E. krivolutskiji*, *E. perelae* Titova, 1973, *E. polygonatus*, *E. sibiricus* Cook, 1899, *Lamyctes pachypes* Takakuwa, 1941, *Lithobius aberantus* (Matic, 1973), *L. orientalis* (Sseliwanoff, 1878), *L. sachalinus* Verhoeff, 1937, *L. brandtii* Sseliwanoff, 1881, *L. fissuratus*, *L. kurchevae* и *L. nihamensis* (Murakami, 1960). Стоит признать, что фауна Chilopoda Приморского края остается недостаточно изученной.

Ключевые слова: губоногие многоножки, фаунистика, список видов, история изучения

Для цитирования: Дьячков Ю. В. История изучения и предварительные данные по Chilopoda Приморского края, Дальний Восток России // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 4. С. 307–314. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-307-314>.

Благодарности: исследование выполнено в рамках проекта FZMW-2023-0006 «Эндемичные, локальные и инвазивные членистоногие животные (Arthropoda) гор Южной Сибири и Центральной Азии: уникальный генофонд горячей точки биоразнообразия» Государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации. Благодарю Гюлли Ш. Фарзалиеву (Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь) за критические замечания.

ZOOLOGY

Review article

The history of the studies and preliminary data on Chilopoda from the Maritime Province, Russian Far East

Yurii V. Dyachkov

Altai State University, Barnaul, Russia, dyachkov793@mail.ru

Abstract. History of the study and list of the Chilopoda species from the Maritime Province are provided. The first data on the centipede fauna of the Maritime Province were published in the end of 19th century, more active research was started from the second half of 20th century. To date, the fauna under consideration consists of 31 species from 12 genera, 7 families, and 4 orders. Seven species, namely *Agnostrup striganovae* (Titova, 1975), *Arrup mamaevi* (Titova, 1975), *Escaryus dentatus* Titova, 1973, *E. krivolutskiji* Titova, 1973, *E. polygonatus* Titova, 1973, *Lithobius fissuratus* Attems, 1934, and *L. kurchevae* (Zalesskaja, 1978), are known from the Maritime Province only. Taxonomic status of the following species requires revision: *Arctogeophilus sachalinus* Verhoeff, 1934, *Geophilus sounkyoensis* Takakuwa, 1937, *Strigamia hirsutipes* (Attems, 1927), *S. cf. transsilvanica* (Verhoeff, 1928), *Arrup mamaevi*, *Escaryus dentatus*, *E. krivolutskiji*, *E. perelae* Titova, 1973, *E. polygonatus*, *E. sibiricus* Cook, 1899, *Lamyctes pachypes* Takakuwa, 1941, *Lithobius aberantus* (Matic, 1973), *L. orientalis* (Sseliwanoff, 1878), *L. sachalinus* Verhoeff, 1937, *L. brandtii* Sseliwanoff, 1881, *L. fissuratus*, *L. kurchevae*, and *L. nihamensis* (Murakami, 1960). It should be recognized, the centipede fauna of the Maritime Province is still insufficiently studied.

Keywords: centipedes, faunistics, species list, history of the studies

For citation: Dyachkov Yu. V. [Fauna and history of the studies of Chilopoda from the Maritime Province, Russian Far East]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2023): pp. 307-314. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-307-314>.

Acknowledgments: the reported study was funded by state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project FZMW-2023-0006 “Endemic, local and invasive arthropods (Arthropoda) of the mountains of South Siberia and Central Asia: a unique gene pool of a biodiversity hotspot”). Thanks go to Gyulli Sh. Farzalieva (Perm State University, Perm) for critical review of the manuscript.

Введение

Первые данные о видовом составе Chilopoda Приморского края (Приморья) были опубликованы О.Ф. Куком [Cook, 1899], который описал *Escaryus sibiricus* Cook, 1899 из Владивостока. Позднее К. Аттемс переописал этот вид [Attems, 1904] и описал новый вид косянки [Attems, 1934] – *Lithobius (Ezembius) fissuratus* Attems, 1934 – из этого же населенного пункта.

Более активные исследования начались во второй половине XX в. С данной территории Л.П. Титова [1973, 1975] описала 6 новых видов геофилов: *Agnostrup striganovae*, *Arrup mamaevi*, *Escaryus dentatus* Titova, 1973, *E. krivolutskiji* Titova, 1973, *E. perelae* Titova, 1973, *E. polygonatus* Titova, 1973, а также привела находки видов, известных из Японии и Корейского полуострова: *Arrup dentatus* (Takakuwa, 1934), *Escaryus japonicus* Attems, 1927 и *E. koreanus* Takakuwa, 1937. В те же годы Н.Т. Залеская [1975, 1978] описала новый род *Dakrobium* Zaleskaja, 1975 с единственным видом – *Dakrobium krivolutskiji* Zaleskaja, 1975 – и *Lithobius (Monotarsobius) kurchevae* (Zaleskaja, 1978), а также привела 6 новых для Приморья видов, известных с сопредельных территорий: *Lithobius (Chinobius) aberantus* (Matic, 1973), *L. (Ch.) sachalinus* Verhoeff, 1937, *L. (Ezembius) microcephalus* Sseliwanoff, 1880, *L. (E.) proximus* Sseliwanoff, 1878, *L. (E.) sibiricus* Gerstfeldt, 1858 и *L. (Monotarsobius) nihamensis* (Murakami, 1960).

Кроме того, в нескольких экологических работах, посвященных фауне беспозвоночных животных Дальнего Востока [Гиляров, Перель, 1973; Молодова, 1973; Курчева, 1977; Ганин, 1997], а также в фаунистической работе по Муриарода Московской области [Залеская, Титова, Головач, 1982] были приведены для Приморья еще несколько видов геофилов и косянок. Н.Т. Залеская и А.А. Шилейко [1991] отметили в Приморье отряд Scolopendromorpha, а Ю.В. Дьячков [Dyachkov, 2022] – отряд Scutigeroformia.

При этом, фауна Chilopoda Приморского края до сих пор остается недостаточно изученной. Цель работы – привести полный список видов Chilopoda, известных с территории Приморского края, и историю их изучения.

Материал и методы

Список составлен на основе литературных данных и приведен в алфавитном порядке. В разделе «Распространение» указываются сопредельные территории Дальнего Востока России, если вид представлен в их фауне.

Список видов

Отр. Geophilomorpha Росоок, 1895

Сем. Geophilidae Leach, 1816

1. *Arctogeophilus macrocephalus* Folkmanová et Dobrožuka, 1960

Распространение: От Украины до Дальнего Востока России (Еврейская автономная область, Чукотский автономный округ, Амурская и Сахалинская области, Хабаровский и Приморский края) [Залеская, Титова, Головач, 1982; Ганин, 1997], Восточный Казахстан [Dyachkov, Tuf, 2019].

2. *Arctogeophilus sachalinus* Verhoeff, 1934

Распространение: Дальний Восток России (Чукотский автономный округ, Сахалинская область и Приморский край) [Verhoeff, 1934; Takakuwa, 1940; Курчева, 1977; Ганин, 1997].

3. *Geophilus sounkyoensis* Takakuwa, 1937

Распространение: Дальний Восток России (Приморский край) [Гиляров, Перель, 1973; Курчева, 1977; Ганин, 1997] и Япония [Takakuwa, 1937].

4. *Pachymerium ferrugineum* (C.L. Koch, 1835)

Распространение: Основной ареал – от Европы [Barber, 2009] до Дальнего Востока России (Амурская область, Еврейская автономная область и Приморский край) [Залеская, Титова, Головач, 1982; Ганин, 1997] и Японии [Barber, 2009].

5. *Strigamia hirsutipes* (Attems, 1927)

Распространение: Дальний Восток России (Приморский край и Сахалинская область) [Гиляров, Перель, 1973; Курчева, 1977; Ганин, 1997] и Япония [Bonato et al., 2012].

Замечания: существуют находки из Юго-Восточной Азии, которые Бонато и др. [Bonato et al., 2012] рассматривают как сомнительные.

6. *Strigamia cf. transilvanica* (Verhoeff, 1928)

Распространение: Центральная Европа [Reip, Voigtländer, 2009], сомнительные находки приводятся из Ростовской области России [Zuev, Evsyukov, 2016], Кавказа [Dyachkov, Zuev, Gichikhanova, 2022; Dyachkov, Zuev, 2023], Алтая [Dyachkov, 2018; Nefediev et al., 2018], Дальнего Востока России (Приморский край и Сахалинская область) [Курчева, 1977; Ганин, 1997], Японии и о. Тайвань [Bonato et al., 2012].

Замечания: Бонато и др. [Bonato et al., 2012] предположили, что, возможно, находки этого вида на Дальнем Востоке связаны с ошибочными определениями.

Сем. Mecistocephalidae Bollman, 1893

7. *Agnostrup striganovae* (Titova, 1975)

Распространение: Дальний Восток России (Приморский край) [Титова, 1975; Ганин, 1997].

8. *Arrup dentatus* (Takakuwa, 1934)

Распространение: Дальний Восток России (Сахалинская область и Приморский край) [Титова, 1975; Ганин, 1997] и Япония [Takakuwa, 1934].

9. *Arrup mamaevi* (Titova, 1975)

Распространение: Дальний Восток России (Приморский край) [Титова, 1975; Ганин, 1997].

Сем. Schendylidae Cook, 1896

10. *Escaryus dentatus* Titova, 1973

Распространение: Дальний Восток России (Приморский край) [Титова, 1973; Курчева, 1977; Ганин, 1997].

11. *Escaryus japonicus* Attems, 1927

Распространение: От Европейской России [Титова, 1973; Волкова, 2016] до Дальнего Востока (Амурская и Сахалинская области, Приморский и Хабаровский края) [Титова, 1973; Гиляров, Перель, 1973; Молодова, 1973; Курчева, 1977; Ганин, 1997], Япония [Attems, 1927], Восточный Казахстан [Dyachkov, Tuf, 2018] и Северный Китай [Takakuwa, Takashima, 1949].

12. *Escaryus koreanus* Takakuwa, 1937

Распространение: От Западной Сибири [Nefediev, Tuf, Farzalieva, 2017; Nefediev, 2019] до Дальнего Востока России (Еврейская автономная область, Амурская область, Хабаровский и Приморский края) [Гиляров, Перель, 1973; Титова, 1973; Курчева, 1977; Ганин, 1997], Восточный Казахстан [Dyachkov, Tuf, 2018], Япония и Северная Корея [Takakuwa, 1940].

13. *Escaryus krivolutskiji* Titova, 1973

Распространение: Дальний Восток России (Приморский край) [Титова, 1973; Курчева, 1977; Ганин, 1997].

14. *Escaryus perelae* Titova, 1973

Распространение: Дальний Восток России (Еврейская автономная область, Амурская область, Хабаровский и Приморский края) [Титова, 1973; Курчева, 1977; Ганин, 1997].

15. *Escaryus polygonatus* Titova, 1973

Распространение: Дальний Восток России (Приморский край) [Титова, 1973; Курчева, 1977; Ганин, 1997].

16. *Escaryus sibiricus* Cook, 1899

Распространение: Дальний Восток России (Приморский край и Амурская область) [Cook, 1899; Attems, 1904; Титова, 1973; Ганин, 1997].

Отр. Lithobiomorpha Росоок, 1895

Сем. Henicopidae Росоок, 1901

17. *Lamyctes pachypes* Takakuwa, 1941

Распространение: Дальний Восток России (Приморский край) [Залесская, 1978; Ганин, 1997] и Япония [Залесская, 1978].

Сем. Lithobiidae Newport, 1844

18. *Dakrobius krivolutskyi* Zaleskaja, 1975
Распространение: Дальний Восток России (Приморский край [Залеская, 1978] и Амурская область [Ганин, 1997]).
19. *Lithobius (Chinobius) aberantus* (Matic, 1973)
Распространение: Дальний Восток России (Приморский и Хабаровский края) [Залеская, 1978] и Япония [Matic, 1973].
20. *Lithobius (Chinobius) orientalis* (Sseliwanoff, 1878)
Распространение: Восточная Сибирь (Красноярский край) [Селиванов, 1881], Дальний Восток России (Хабаровский и Приморский края) [Залеская, 1978; Ганин, 1997].
21. *Lithobius (Chinobius) sachalinus* Verhoeff, 1937
Распространение: Дальний Восток России (Сахалинская область, Хабаровский и Приморский края) [Залеская, 1978; Ганин, 1997] и Япония [Залеская, 1978].
22. *Lithobius (Ezembius) brandtii* Sseliwanoff, 1881
Распространение: Дальний Восток России (Хабаровский и Приморский края) [Залеская, 1978; Ганин, 1997].
23. *Lithobius (Ezembius) fissuratus* Attems, 1934
Распространение: Дальний Восток России (Приморский край) [Attems, 1934; Залеская, 1978].
24. *Lithobius (Ezembius) microcephalus* Sseliwanoff, 1880
Распространение: Восточная Сибирь (только Республика Бурятия) и Дальний Восток России (Амурская область, Хабаровский и Приморский края) [Залеская, 1978; Ганин, 1997].
25. *Lithobius (Ezembius) proximus* Sseliwanoff, 1878
Распространение: От Украины и Польши [Wytwer, Tajovský, 2019; Dyachkov et al., 2022] до Дальнего Востока России (Амурская и Сахалинская области, Приморский край) [Залеская, 1978; Ганин, 1997].
26. *Lithobius (Ezembius) sibiricus* Gerstfeldt, 1858
Распространение: Западная и Восточная Сибирь [Залеская, 1978; Nefediev, Farzalieva, 2020], Дальний Восток России (Приморский и Хабаровский края, Сахалинская и Амурская области) [Залеская, 1978; Ганин, 1997], Монголия [Dyachkov, Farzalieva, 2023].
27. *Lithobius (Monotarsobius) kurchevae* (Zaleskaja, 1978)
Распространение: Дальний Восток России (Приморский край) [Залеская, 1978; Ганин, 1997].
28. *Lithobius (Monotarsobius) nihamensis* (Murakami, 1960)
Распространение: Дальний Восток России (Амурская область, Хабаровский и Приморский края) [Залеская, 1978; Ганин, 1997], Япония [Murakami, 1960] и Непал [Eason, 1989].
29. *Lithobius (Monotarsobius) porathi* Sseliwanoff, 1881
Распространение: Дальний Восток России (Сахалинская область, Хабаровский и Приморский края) [Ганин, 1997; Eason, 1996], Северная Корея (приводится как *L. dziadoszi* Matic, 1970; см. ниже).
Замечания: Н.Т. Залеская [1978: 157] предположила, что *L. dziadoszi* является младшим синонимом *L. porathi*, что впоследствии было подтверждено Изоном [Eason, 1996: 121].

Отр. Scolopendromorpha Leach, 1815

Сем. Scolopendridae Newport, 1844

30. *Scolopendra subspinipes* Leach, 1815
Распространение: Дальний Восток России (Приморский край) [Залеская, Шилейко, 1991], тропические и субтропические регионы Азии, Индонезия, Филиппины, некоторые острова Тихого океана, Южная Америка, Африка [Simaikis, Edgecombe, 2013; Siriwut et al., 2016].

Отр. Scutigermorpha Pocock, 1895

Сем. Scutigeridae Leach, 1814

31. *Thereuonema tuberculata* (Wood, 1862)
Распространение: Дальний Восток России (Приморский край) [Dyachkov, 2022], Восточный Китай,

Корейский полуостров, Япония [Würmli, 1975; Stoev, Geoffroy, 2004]. Интродуцирован в Великобританию [Barber, 2011] и Северную Америку [Reeves, Miller, 2022].

Заключение

Таким образом, на сегодняшний день фауна Chilopoda Приморского края насчитывает как минимум 31 вид из 12 родов, 7 семейств и 4 отрядов. Семь видов (*Agnostrup striganovae*, *Arrup tamaevi*, *Escaryus dentatus*, *E. krivolutskiji*, *E. polygonatus*, *Lithobius fissuratus* и *L. kurchevae*) известны только из рассматриваемого региона. Таксономический статус следующих видов требует современной оценки: *Arctogeophilus sachalinus*, *Geophilus sounkyoensis*, *Strigamia hirsutipes*, *S. cf. transsilvanica*, *Arrup tamaevi*, *Escaryus dentatus*, *E. krivolutskiji*, *E. perelae*, *E. polygonatus*, *E. sibiricus*, *Lamyctes pachypes*, *Lithobius aberantus*, *L. orientalis*, *L. sachalinus*, *L. brandtii*, *L. fissuratus*, *L. kurchevae* и *L. nihamensis*.

Фауна Chilopoda Приморского края по таксономическому разнообразию превышает соответствующую фауну Ростовской области [Zuev, Evsyukov, 2016] и Ставропольского края [Zuev, 2016, 2017] и, кажется, является одной из самых богатых в России. Кроме того, следует ожидать нахождение в Приморском крае видов, известных с сопредельных территорий России (Хабаровский край, Амурская область, Сахалин и Курильские острова), Китая (Маньчжурия), Корейского п-ова и Японии и новых для науки видов. Кроме того, учитывая нахождение европейских видов на Сахалине и Курильских островах (возможно, интродуцентов) [Eason, 1996], вероятно нахождение интродуцентов и в Приморском крае.

Список источников

1. Волкова Ю.С. Аннотированный каталог геофиломорфных многоножек (Chilopoda, Geophilomorpha) Европейской России // Зоологический журнал. 2016. Т. 95, № 6. С. 669–678.
2. Ганин Г.Н. Почвенные животные Уссурийского края. Владивосток-Хабаровск: Даль-наука, 1997. 160 с.
3. Гиляров М.С., Перель Т.С. Комплексы почвенных беспозвоночных хвойно-широколиственных лесов Дальнего Востока как показатель типа их почв // Экология почвенных беспозвоночных. М.: Наука, 1973. С. 40–59.
4. Залеская Н.Т. Новые виды и роды клянок (Chilopoda, Lithobiomorpha) из Средней Азии и с Дальнего Востока // Зоологический журнал. 1975. Т. 54, № 9. С. 1316–1325.
5. Залеская Н.Т. Определитель многоножек-клянок СССР (Chilopoda, Lithobiomorpha). М., Наука, 1978. 212 с.
6. Залеская Н.Т., Титова Л.П., Головач С.И. Фауна многоножек (Myriapoda) Подмоскowsья // Почвенные беспозвоночные Московской области. Л.: Наука, 1982. С. 187–195.
7. Залеская Н.Т., Шилейко А.А. Сколопендровые многоножки (Chilopoda, Scolopendromorpha). М.: Наука, 1991. 103 с.
8. Курчева Г.Ф. Почвенные беспозвоночные Советского Дальнего Востока. М.: Наука, 1977. 130 с.
9. Молодова Л.П. Фауна почвенных беспозвоночных Южного Сахалина // Экология почвенных беспозвоночных. М.: Наука, 1973. С. 60–74.
10. Селиванов А.В. Lithobiidae, хранящиеся в музее Императорской Академии наук // Записки Академии Наук. 1881. Т. 37. С. 121–142.
11. Титова Л.П. Новые виды рода *Escaryus* Cook et Collins (Schendylidae, Chilopoda) // Экология почвенных беспозвоночных. М.: Наука, 1973. С. 74–119.
12. Титова Л.П. Геофилиды семейства Mecistoccephalidae в фауне СССР (Chilopoda) // Зоологический журнал. 1975. Т. 54, № 1. С. 39–48.
13. Attems C. Central- und Hoch-asiatische Myriapoden. Gesammelt im Jahre 1900 von Dr. von Almassy und Dr. von Stummer // Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Systematik. 1904. Vol. 20. P. 113–130.
14. Attems C. Neue Chilopoden // Zoologischer Anzeiger. 1927. Bd. 72. P. 291–305.
15. Attems C. Einige neue Geophiliden und Lithobiiden des Hamburger Museums // Zoologischer Anzeiger. 1934. Bd. 107. P. 310–317.
16. Barber A.D. Centipedes. Keys and notes for the identification of the species // Synopses of the British fauna (new series). 2009. № 58. P. 1–228.
17. Barber A.D. *Thereuonema tuberculata* (Wood, 1863), a scutigermorph centipede from China, found in a warehouse at Swindon // Bulletin of the British Myriapod and Isopod Group. 2011. Vol. 25. P. 49–50.
18. Bonato L. et al. Species diversity of *Strigamia* Gray, 1843 (Chilopoda: Linotaeniidae): a preliminary synthesis // Zootaxa. 2012. Vol. 3593. P. 1–39.
19. Cook O.F. The Geophilidea of Florida Keys // Proceedings of the Entomological Society of Washington. 1899. Vol. 4. P. 303–312.

20. Dyachkov Yu.V. Linotaeniidae Cook, 1899 (Chilopoda: Geophilomorpha), a new family to the fauna of Kazakhstan // Ukrainian Journal of Ecology. 2018. Vol. 8, № 4. P. 255–257.
21. Dyachkov Yu.V. Thereuoneminae Verhoeff, 1905 (Chilopoda: Scutigermorpha: Scutigeridae), a new subfamily for the Russian fauna // Acta Biologica Sibirica. 2022. Vol. 8. P. 469–473.
22. Dyachkov Yu.V., Farzalieva G.Sh. An annotated checklist of Chilopoda from Mongolia // Ecologica Montenegrina. 2023. Vol. 64. P. 221–241.
23. Dyachkov Yu.V., Farzalieva G.Sh., Tuf I.H. An annotated checklist of centipedes (Chilopoda) of Middle Asian countries, part 1. Lithobiomorpha // Zootaxa. 2022. Vol. 5100. P. 151–188.
24. Dyachkov Yu.V., Tuf I.H. New data on the genus *Escarys* Cook et Collins, 1891 (Chilopoda: Geophilomorpha: Schendylidae) from Kazakhstan // Arthropoda Selecta. 2018. Vol. 26, No. 4. P. 293–299.
25. Dyachkov Yu.V., Tuf I.H. New data on the family Geophilidae Leach, 1815 (Chilopoda: Geophilomorpha) from Kazakhstan // Far Eastern Entomologist. 2019. Vol. 391. P. 24–28.
26. Dyachkov Yu.V., Zuev R.V. Myriapoda (Chilopoda, Diplopoda) of the South Ossetia // Acta Biologica Sibirica. 2023. Vol. 9. P. 157–165.
27. Dyachkov Yu.V., Zuev R.V., Gichikhanova U.A. Centipedes (Chilopoda) from the Dagestan, Northern Caucasus, Russia // Ecologica Montenegrina. 2022. Vol. 52. P. 68–89.
28. Eason E.H. Lithobiomorpha from Sakhalin Island, the Kamchatka Peninsula and the Kurile Islands (Chilopoda) // Arthropoda Selecta. 1996. Vol. 5, № 3/4. P. 117–123.
29. Eason E.H. Lithobiidae from the Nepal Himalayas with descriptions of ten new species of *Lithobius* and *Australobius* (Chilopoda: Lithobiomorpha) // Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik. 1989. Vol. 116. P. 335–372.
30. Matic Z. Revision du genre *Chinobius* Verhoeff avec des descriptions de trois espèces nouvelles (Chilopoda Lithobiidae) // Annales Zoologici, Instytut Zoologiczny, Polska Akademia Nauk. 1973. Vol. 30. P. 33–47.
31. Murakami Y. Postembryonic development of the common Myriapoda of Japan VI. A new *Monotarsobius* from Japan (Chilopoda; Lithobiomorpha; Lithobiidae) // Zoological Magazine, Tokyo. 1960. Vol. 69. P. 288–291.
32. Nefediev P.S. New records of geophilomorph centipedes (Chilopoda: Geophilomorpha) from natural and anthropogenic habitats of Siberia // Far Eastern Entomologist. 2019. Vol. 380. P. 23–28.
33. Nefediev P.S., Farzalieva G.Sh. New records of lithobiid centipedes from Siberia, Russia (Chilopoda: Lithobiomorpha: Lithobiidae) // Arthropoda Selecta. 2020. Vol. 29, № 2. P. 185–198.
34. Nefediev P.S. et al. Millipede and centipede assemblages on the northern and southern slopes of the lowland Altai, southwestern Siberia, Russia (Diplopoda, Chilopoda) // ZooKeys. 2018. Vol. 741. P. 219–254.
35. Nefediev P.S., Tuf I.H., Farzalieva G.Sh. Centipedes from urban areas in southwestern Siberia, Russia (Chilopoda). Part 2. Geophilomorpha // Arthropoda Selecta. 2017. Vol. 26, № 1. P. 8–14.
36. Reeves W.K., Miller M.M. *Thereuonema tuberculata* (Wood, 1862) (Chilopoda, Scutigermorpha, Scutigerae) from forested habitats in North America // Check List. 2022. Vol. 18. P. 431–434.
37. Reip H.S., Voigtländer K. Diplopoda and Chilopoda of Thuringia // Soil Organisms. 2009. Vol. 81. P. 635–645.
38. Simaiakis S.M., Edgecombe G.D. Scolopendromorph centipedes (Chilopoda: Scolopendromorpha) in the Natural History Museum (London): A review of the hitherto unidentified species collected in Africa, with remarks on taxonomy and distribution, and a new species of *Otostigmus* (*Parotostigmus*) // Zootaxa. 2013. Vol. 3734. P. 169–198.
39. Siritwut W. et al. A taxonomic review of the centipede genus *Scolopendra* Linnaeus, 1758 (Scolopendromorpha, Scolopendridae) in mainland Southeast Asia, with description of a new species from Laos // ZooKeys. 2016. Vol. 590. P. 1–124.
40. Stoev P., Geoffroy J. An annotated catalogue of the scutigermorph centipedes in the collection of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (France) (Chilopoda: Scutigermorpha) // Zootaxa. 2004. Vol. 635. P. 1–12.
41. Takakuwa Y. Neue Japanische Mecistocephalidae // Annotationes Zoologicae Japonenses. 1934. Vol. 14. P. 355–363.
42. Takakuwa Y. The *Geophilus* species of Japan // Zoological Magazine. 1937. Vol. 49. P. 282–286.
43. Takakuwa Y. Geophilomorpha. Fauna Nipponica // 1940. Vol. 9. P. 1–156.
44. Takakuwa Y., Takashima H. Myriapods collected in Shansi, North China // Acta Arachnologica. 1949. Vol. 11. P. 51–69. (In Japanese, with English summary).
45. Verhoeff K.W. Beiträge zur Systematik und Geographie der Chilopoden // Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik. 1934. Vol. 66. P. 1–112.
46. Würmli M. Revision der Hundertfüßer-Gattung *Thereuonema* (Chilopoda: Scutigeridae) // Entomologica Germanica. 1975. Vol. 2. P. 189–196.
47. Wytwer J., Tajovský K. The Siberian centipede species *Lithobius proximus* Sselivanoff, 1878 (Chilopoda, Lithobiomorpha): a new member of the Polish fauna // ZooKeys. 2019. Vol. 821. P. 1–10.

48. Zuev R.V. Centipedes (Chilopoda) from the Stavropol Territory, northern Caucasus, Russia // *Arthropoda Selecta*. 2016. Vol. 25, № 1. P. 23–38.
49. Zuev R.V. Two new species of lithobiid centipedes (Chilopoda: Lithobiomorpha) from the northern Caucasus, Russia // *Arthropoda Selecta*. 2017. Vol. 26, № 1. P. 15–24.
50. Zuev R.V., Evsyukov A.P. Centipedes (Chilopoda) from the Rostov-on-Don Region, southern Russia // *Russian Entomological Journal*. 2016. Vol. 25, № 4. P. 417–426.

References

1. Volkova Yu.S. [An annotated checklist of geophilomorphs (Chilopoda, Geophilomorpha) of European Russia]. *Zoologičeskij žurnal*. V. 95, No. 6 (2016): pp. 669-678. (In Russ.)
2. Ganin G.N. *Počvennye životnye Ussurijskogo kraja* [Soil invertebrates of the Ussuri Region]. Vladivostok-Khabarovsk, Dal'-nauka Publ., 1997. 160 p. (In Russ.)
3. Ghilarov M.S., Perel T.S. [Complexes of soil invertebrates of coniferous-deciduous forests of Far East as indicator of its types]. *Ėkologija počvennykh bespozvonočnykh* [Ecology of soil invertebrates]. Moscow, Nauka Publ., 1973, pp. 40-59. (In Russ.)
4. Zalesskaja N.T. [New species and genera of lithobiomorph centipedes (Chilopoda, Lithobiomorpha) from Middle Asia and Far East]. *Zoologičeskij žurnal*. V. 54, No. 9 (1975): pp. 1316-1325. (In Russ.)
5. Zalesskaja N.T. *Opređitel' mnogonožek-kostjanokSSSR* [Identification book of the lithobiomorph centipedes of the USSR (Chilopoda: Lithobiomorpha)]. Moscow, Nauka Publ., 1978. 212 p.
6. Zalesskaja N.T., Titova L.P., Golovach S.I. [Fauna of myriapods (Myriapoda) of the Moscow region]. *Počvennye bespozvonočnye Moskovskoj oblasti* [Soil invertebrates of the Moscow region]. Leningrad, Nauka Publ., 1982, pp. 187-195. (In Russ.)
7. Zalesskaja N.T., Schileyko A.A. *Skolopendrovye mnogonožki* [Scolopendromorph centipedes (Chilopoda, Scolopendromorpha)]. Moscow, Nauka Publ., 1991. 103 p. (In Russ.)
8. Kurcheva G.F. *Počvennye bespozvonočnye Sovetskogo Dal'nego Vostoka* [Soil invertebrates of Soviet Far East]. Moscow, Nauka Publ., 1977. 130 p. (In Russ.)
9. Molodova L.P. [Fauna of soil invertebrates of Southern Sakhalin]. *Ėkologija počvennykh bespozvonočnykh* [Ecology of soil invertebrates]. Moscow, Nauka Publ., 1973, pp. 60-74. (In Russ.)
10. Seliwanoff A.W. [Lithobiidae deposited in the museum of Imperial Academy of Sciences]. *Zapiski Imperatorskoj Akademii Nauk*. V. 37 (1881): pp. 121-142. (In Russ.)
11. Titova L.P. [A new species of the genus *Escaryus* Cook et Collins (Schendylidae, Chilopoda)]. *Ėkologija počvennykh bespozvonočnykh* [Ecology of soil invertebrates]. Moscow, Nauka Publ., 1973, pp. 74-119. (In Russ.)
12. Titova L.P. [Geophilidae of the family Mecistocephalidae in the fauna of USSR (Chilopoda)]. *Zoologičeskij žurnal*. V. 54, No. 1 (1975): pp. 39-48. (In Russ.)
13. Attems C. Central- und Hoch-asiatische Myriapoden. Gesammelt im Jahre 1900 von Dr. von Almassy und Dr. von Stummer. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Systematik*. V. 20 (1904): pp. 113-130.
14. Attems C. Neue Chilopoden. *Zoologischer Anzeiger*. Bd. 72 (1927): pp. 291-305.
15. Attems C. Einige neue Geophiliden und Lithobiiden des Hamburger Museums. *Zoologischer Anzeiger*. Bd. 107 (1934): pp. 310-317.
16. Barber A.D. Centipedes. Keys and notes for the identification of the species. *Synopses of the British fauna (new series)*. No. 58 (2009): pp. 1–228.
17. Barber A.D. *Thereuonema tuberculata* (Wood, 1863), a scutigeromorph centipede from China, found in a warehouse at Swindon. *Bulletin of the British Myriapod and Isopod Group*. V. 25 (2011): pp. 49-50.
18. Bonato L., Dányi L., Socci A.A., Minelli A. Species diversity of *Strigamia* Gray, 1843 (Chilopoda: Lino-taeniidae): a preliminary synthesis. *Zootaxa*. V. 3593 (2012): pp. 1-39.
19. Cook O.F. The Geophilidea of Florida Keys. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. V. 4 (1899): pp. 303-312.
20. Dyachkov Yu.V. Lino-taeniidae Cook, 1899 (Chilopoda: Geophilomorpha), a new family to the fauna of Kazakhstan. *Ukrainian Journal of Ecology*. V. 8, No. 4 (2018): pp. 255-257.
21. Dyachkov Yu.V. Thereuoneminae Verhoeff, 1905 (Chilopoda: Scutigeromorpha: Scutigeridae), a new subfamily for the Russian fauna. *Acta Biologica Sibirica*. V. 8 (2022): pp. 469-473.
22. Dyachkov Yu.V., Farzalieva G.Sh. An annotated checklist of Chilopoda from Mongolia. *Ecologica Montenegrina*. V. 64 (2023): pp. 221-241.
23. Dyachkov Yu.V., Farzalieva G.Sh., Tuf I.H. An annotated checklist of centipedes (Chilopoda) of Middle Asian countries, part 1. Lithobiomorpha. *Zootaxa*. V. 5100 (2022): pp. 151-188.
24. Dyachkov Yu.V., Tuf I.H. New data on the genus *Escaryus* Cook et Collins, 1891 (Chilopoda: Geophilomorpha: Schendylidae) from Kazakhstan. *Arthropoda Selecta*. V. 26, No. 4 (2018): pp. 293-299.
25. Dyachkov Yu.V., Tuf I.H. New data on the family Geophilidae Leach, 1815 (Chilopoda: Geophilomorpha) from Kazakhstan. *Far Eastern Entomologist*. V. 391 (2019): pp. 24-28.
26. Dyachkov Yu.V., Zuev R.V. Myriapoda (Chilopoda, Diplopoda) of the South Ossetia. *Acta Biologica Sibirica*. V. 9 (2023): pp. 157-165.

27. Dyachkov Yu.V., Zuev R.V., Gichikhanova U.A. Centipedes (Chilopoda) from the Dagestan, Northern Caucasus, Russia. *Ecologica Montenegrina*. V. 52 (2022): pp. 68-89.
28. Eason E.H. Lithobiomorpha from Sakhalin Island, the Kamchatka Peninsula and the Kurile Islands (Chilopoda). *Arthropoda Selecta*. V. 5, No. 3/4 (1996): pp. 117-123.
29. Eason E.H. Lithobiidae from the Nepal Himalayas with descriptions of ten new species of *Lithobius* and *Australobius* (Chilopoda: Lithobiomorpha). *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik*. V. 116 (1989): pp. 335-372.
30. Matic Z. Revision du genre *Chinobius* Verhoeff avec des descriptions de trois espèces nouvelles (Chilopoda Lithobiidae). *Annales Zoologici, Instytut Zoologiczny, Polska Akademia Nauk*. V. 30 (1973): pp. 33-47.
31. Murakami Y. Postembryonic development of the common Myriapoda of Japan VI. A new *Monotarsobius* from Japan (Chilopoda; Lithobiomorpha; Lithobiidae). *Zoological Magazine, Tokyo*. V. 69 (1960): pp. 288-291.
32. Nefediev P.S. New records of geophilomorph centipedes (Chilopoda: Geophilomorpha) from natural and anthropogenic habitats of Siberia. *Far Eastern Entomologist*. V. 380 (2019): pp. 23-28.
33. Nefediev P.S., Farzalieva G.Sh. New records of lithobiid centipedes from Siberia, Russia (Chilopoda: Lithobiomorpha: Lithobiidae). *Arthropoda Selecta*. V. 29, No. 2 (2020): pp. 185-198.
34. Nefediev P.S., Farzalieva G.Sh., Tuf I.H., Nedoev Kh.Kh., Niyazov S.T. Millipede and centipede assemblages on the northern and southern slopes of the lowland Altai, southwestern Siberia, Russia (Diplopoda, Chilopoda). *ZooKeys*. V. 741 (2018): pp. 219-254.
35. Nefediev P.S., Tuf I.H., Farzalieva G.Sh. Centipedes from urban areas in southwestern Siberia, Russia (Chilopoda). Part 2. Geophilomorpha. *Arthropoda Selecta*. V. 26 No. 1 (2017): pp. 8-14.
36. Reeves W.K., Miller M.M. *Thereuonema tuberculata* (Wood, 1862) (Chilopoda, Scutigermorpha, Scutigeriidae) from forested habitats in North America. *Check List*. V. 18 (2022): pp. 431-434.
37. Reip H.S., Voigtländer K. Diplopoda and Chilopoda of Thuringia. *Soil Organisms*. V. 81 (2009): pp. 635-645.
38. Simaiakis S.M., Edgecombe G.D. Scolopendromorph centipedes (Chilopoda: Scolopendromorpha) in the Natural History Museum (London): A review of the hitherto unidentified species collected in Africa, with remarks on taxonomy and distribution, and a new species of *Otostigmus* (*Parotostigmus*). *Zootaxa*. V. 3734 (2013): pp. 169-198.
39. Siritwut W., Edgecombe G.D., Sutcharit C., Tongkerd P., Panha S. A taxonomic review of the centipede genus *Scolopendra* Linnaeus, 1758 (Scolopendromorpha, Scolopendridae) in mainland Southeast Asia, with description of a new species from Laos. *ZooKeys*. V. 590 (2016): pp. 1-124.
40. Stoev P., Geoffroy J. An annotated catalogue of the scutigermorph centipedes in the collection of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (France) (Chilopoda: Scutigermorpha). *Zootaxa*. V. 635 (2004): pp. 1-12.
41. Takakuwa Y. Neue Japanische Mecistocephalidae. *Annotationes Zoologicae Japonenses*. V. 14 (1934): pp. 355-363.
42. Takakuwa Y. The *Geophilus* species of Japan. *Zoological Magazine*. V. 49 (1937): pp. 282-286.
43. Takakuwa Y. Geophilomorpha. *Fauna Nipponica*. V. 9 (1940): pp. 1-156.
44. Takakuwa Y., Takashima H. Myriapods collected in Shansi, North China. *Acta Arachnologica*. V. 11 (1949): pp. 51-69 (in Japanese, with English summary).
45. Verhoeff K.W. Beiträge zur Systematik und Geographie der Chilopoden. *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik*. V. 66 (1934): pp. 1-112.
46. Würmli M. Revision der Hundertfüßer-Gattung *Thereuonema* (Chilopoda: Scutigeriidae). *Entomologica Germanica*. V. 2 (1975): pp. 189-196.
47. Wytwer J., Tajovský K. The Siberian centipede species *Lithobius proximus* Sselivanoff, 1878 (Chilopoda, Lithobiomorpha): a new member of the Polish fauna. *ZooKeys*. V. 821 (2019): pp. 1-10.
48. Zuev R.V. Centipedes (Chilopoda) from the Stavropol Territory, northern Caucasus, Russia. *Arthropoda Selecta*. V. 25, No. 1 (2016): pp. 23-38.
49. Zuev R.V. Two new species of lithobiid centipedes (Chilopoda: Lithobiomorpha) from the northern Caucasus, Russia. *Arthropoda Selecta*. V. 26, No. 1 (2017): pp. 15-24.
50. Zuev R.V., Evsyukov A.P. Centipedes (Chilopoda) from the Rostov-on-Don Region, southern Russia. *Russian Entomological Journal*. V. 25, No. 4 (2016): pp. 417-426.

Статья поступила в редакцию 28.09.2023; одобрена после рецензирования 09.10.2023; принята к публикации 20.11.2023.

The article was submitted 28.09.2023; approved after reviewing 09.10.2023; accepted for publication 20.11.2023.

Информация об авторе

Ю. В. Дьячков – младший научный сотрудник.

Information about the author

Yu. V. Dyachkov – junior researcher.

ЗООЛОГИЯ

Научная статья

УДК 599.009

doi: 10.17072/1994-9952-2023-4-315-322

**Белая и тундряная куропатки в заповеднике «Басеги».
Виды на южной границе ареала**

Виктор Валерьевич Семенов

Государственный заповедник «Басеги», Гремячинск, Пермский край, Россия, zbasegi@mail.ru

Аннотация. Приводится анализ многолетней (1984–2023 гг.) динамики регистраций белой и тундряной куропаток на территории заповедника «Басеги» (Средний Урал, Пермский край). Систематизируются имеющиеся материалы по частоте и содержанию встреч указанных видов в Басегах, обобщаются многолетние полевые наблюдения автора статьи по специфике территориального распределения белой и тундряной куропаток в районах их совместного обитания, делаются выводы о существующих тенденциях освоения данными видами тетеревиных птиц крайних южных рубежей своего ареала на западном макросклоне Уральских гор. Редкие, но достаточно регулярные встречи белых куропаток, наблюдавшиеся на протяжении последних 40 лет на всех трёх массивах хребта Басеги (г. Северный, Средний и Южный Басег), а также на верховых болотах и лесных дорогах в прилегающей таёжной зоне, позволяют определить статус пребывания этого вида в заповеднике, как редкой, малочисленной, периодически гнездящейся птицы. Отмеченные в мае и сентябре 2023 г. достоверные факты регистраций на г. Северный Басег тундряной куропатки позволяют включить данный вид в перечень обитателей заповедной территории. Однако статус пребывания этой птицы в Басегах в настоящее время неясен и требует уточнения.

Ключевые слова: тундряная куропатка, белая куропатка, южный рубеж ареала, характерные станции, горные биотопы, регистрации встреч, низкогорья

Для цитирования: Семенов В. В. Белая и тундряная куропатки в заповеднике «Басеги». Виды на южной границе ареала // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 4. С. 315–322. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-315-322>.

Благодарности: работа выполнена в рамках госзадания ФГБУ "Государственный заповедник "«Басеги»".

ZOOLOGY

Original article

**White and tundra partridges in the Basegi Nature Reserve.
Species on the southern border of the range**

Viktor V. Semenov

Basegi State Reserve, Gremyachinsk, Perm Krai, Russia, zbasegi@mail.ru

Abstract. The article analyzes the long-term (1984–2023) dynamics of registrations of white and tundra partridges on the territory of the Basegi Reserve (Middle Urals, Perm Krai). The author systematizes the available materials on the frequency and content of encounters of these species in Basegas, summarizes his own long-term field observations on the specifics of the territorial distribution of white and tundra partridges in the areas of their joint habitat, draws conclusions about the existing trends in the development of these species of grouse birds of the extreme southern boundaries of their range on the western macroscline of the Ural Mountains. Rare, but fairly regular meetings of white partridges observed over the past 40 years on all three massifs of the Basegi ridge (the Northern, Middle and Southern Basegi mountains), as well as on the upper marshes and forest roads in the adjacent taiga zone, allow us to determine the status of this species in the reserve as rare, small, periodically nesting birds. Reliable facts of registration of tundra partridge on the Northern Basegi Mountain noted in May and September 2023 make it possible to include this species in the list of inhabitants of the protected area. However, the status of this bird's stay in Basegi is unclear and requires clarification.

Keywords: tundra partridge, white partridge, southern boundary of the range, characteristic stations, mountain biotopes, registration of meetings, low mountains

For citation: Semenov V. V. [White and tundra partridges in the Basegi Nature Reserve. Species on the southern border of the range]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2023): pp. 315-322. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-315-322>.

Acknowledgments: the work was carried out within the framework of the state task of the Federal State Budgetary Institution "Basegi State Reserve".

Введение

За сорокалетний период существования заповедника «Басеги» (с 1982 г. по настоящее время) научным отделом особо охраняемой природной территории (ООПТ) были накоплены обширные и многообразные материалы по распространению, экологии и динамике численности тетеревиных птиц, обитающих в данном районе Среднего Урала. Эта информация в разные годы неоднократно обобщалась в публикациях сотрудников заповедника [Бояршинов, Делидова, 1989; Бояршинов, Адиев, 1995; Курулюк, 2000; Наумкин, 2012; Курулюк, Наумкин, 2014]. Данные работы были в основном посвящены анализу состояния популяций обычных и многочисленных на ООПТ представителей семейства Тетеревиных: глухаря *Tetrao urogallus* (L., 1758), тетерева *Lyrurus tetrix* (L., 1758) и рябчика *Tetrastes bonasia* (L., 1758). Наиболее подробная обобщающая сводка по редкой и малочисленной в заповеднике «Басеги» белой куропатке *Lagopus lagopus* (L., 1758) была опубликована в 2012 г. [Наумкин, 2012]. За минувшие с того времени 11 лет сотрудниками данной ООПТ получены новые факты по встречам в районе хр. Басеги белой и тундряной *Lagopus mutus* (Montin, 1781) куропаток.

Данная статья представляет собой попытку систематизации накопленных за 40 лет сведений по распространению этих видов тетеревиных птиц в заповеднике «Басеги» и синтеза этой информации с имеющимися данными по закономерностям их территориального распределения на Северном и Среднем Урале вблизи южных границ ареалов.

Материал и методы

Основой для подготовки настоящей публикации послужили данные научной картотеки заповедника «Басеги», а также собственные многолетние и всесезонные наблюдения автора за спецификой территориального распределения белой и тундряной куропаток в районах их совместного обитания на землях заповедника «Вишерский» (Пермский край, Северный Урал). Часть авторских наблюдений, отражённых в полевых дневниках, фотоснимках и видеофрагментах, собранных за период с 2005 по 2017 гг., ранее не публиковалась.

Южные границы ареалов белой и тундряной куропаток на западном макросклоне Уральских гор и в Камском Предуралье

Южную границу гнездового ареала белой куропатки *Lagopus lagopus* (L., 1758) в Камском Предуралье обычно проводят по широте Перми [Наумкин, 2012], то есть примерно по 58° с.ш. На севере Пермского края, примерно от 59,5° с.ш. (район г. Березники) эта птица уже обитает постоянно, гнездится как на обширных верховых болотах прикамских равнин, так и на западном макросклоне и осевом хребте гор Северного Урала. Южнее в Пермском крае белая куропатка встречается в основном во время межсезонных и зимних кочёвок [Казаков, 2001]. На восточном макросклоне Уральских гор, в равнинном Зауралье и Западной Сибири (Свердловская, Челябинская, Курганская, Омская, Новосибирская обл.) зона естественного расселения белой куропатки простирается гораздо южнее, вплоть до казахских степей, но эти лесостепные и степные районы заселяет другой подвид [Рябицев, 2008].

Территория заповедника «Басеги» расположена на крайнем южном рубеже мест гнездования белой куропатки в горной части западного макросклона Урала. Эту птицу периодически регистрировали на данной ООПТ, начиная с 1986 г. В картотеке заповедника за 1984–2023 гг. имеются описания 15 таких наблюдений (см. таблицу далее по тексту). Не менее 5 аналогичных случаев, произошедших в этот период, в карточках встреч не отражены, но указаны в публикации Д.В. Наумкина, проанализировавшего и обобщившего результаты наблюдений белых куропаток на охраняемой территории заповедника «Басеги» за 1984–2011 гг. [Наумкин, 2012].

Ареал тундряной куропатки *Lagopus mutus* (Montin, 1781) в пределах административных границ Пермского края гораздо меньше, чем у белой куропатки и жёстко привязан к горным районам. В равнинных и предгорных районах Камского Предуралья этот вид не встречается, обитает только на северо-востоке региона. По горно-тундровым участкам Полярного, Приполярного и Северного Урала, от берегов Карского моря по вершинам гор далеко на юг тянется очень узкий, протяжённый, местами прерывистый и мозаичный уральский очаг расселения этого вида. По имеющимся в литературе данным современная область гнездования тундряной куропатки простирается до юга Северного Урала [Рябицев, 2008],

что говорит о том, что территория заповедника «Басеги», относящаяся к Среднему Уралу, в эту зону не входит. Тем не менее, тундряная куропатка на данной ООПТ, была достоверно зарегистрирована в мае и сентябре 2023 г. При этом в мае на г. Северный Басег было отмечено сразу пять птиц и наблюдалось активное токование (таблица).

Закономерности распределения типичных стадий белой и тундряной куропаток в районах их совместного обитания в основном ареале (Северный Урал) в сравнении с территорией заповедника «Басеги» (Средний Урал, южная граница ареалов)

По многолетним всесезонным наблюдениям автора, проведённым в заповеднике «Вишерский» (2000–2017 гг.), расположенном в 250 км к северу от Басегов, на пермской части западного макросклона Северного Урала, оба вида куропаток обитают совместно и в значительном количестве [Колбин, Семенов, 2006, Семенов, 2011]. При этом они занимают различные, частично пересекающиеся горные станции.

Белая куропатка в бесснежное время года наиболее обильна в низкогорьях, расположенных в диапазоне высот от 750 до 950 м над ур. м. вдоль верхней границы подгольцового пояса и нижней границы горной тундры. Этот вид обычен на участках, занятых горными болотами, мезо- и мелкотравными луговинами, густыми ивняками, горными пустошами, зарослями можжевельника сибирского, травяно-моховыми, кустарничковыми и мохово-лишайниковыми тундрами, а также местами в островных горных криволесьях из берёзы извилистой. В осеннее межсезонье значительная часть белых куропаток покидает горные станции и перекочёвывает в таёжную зону. Зимой их регулярно отмечают на обочинах лесных дорог и по берегам рек. Там белые куропатки активно кормятся на ивах. Судя по отдельным встречам, некоторая часть птиц остаётся зимовать в горных редколесьях и криволесьях. Однако, в целом, зимой в горах заповедника «Вишерский» белая куропатка встречается заметно реже, чем тундряная.

Тундряная куропатка в весенне-летнее время держится несколько выше по склонам, на участках низко- и среднегорий, занятых тундровой растительностью и каменными россыпями. Эта птица наиболее обильна на обширных участках каменисто-лишайниковых тундр, чередующихся с ерниками (зарослями карликовой берёзки). Такие угодья тянутся в меридиональном направлении по плоским платообразным вершинам гор Северного Урала на высотах 950–1 200 м над ур. м. Отдельные особи и группы тундряных куропаток заселяют также массивы каменных осыпей, скал останцев и локальные каменистые возвышения, расположенные в низкогорьях (850–950 м над ур. м.). В таких местах, окружённых со всех сторон типичными станциями белой куропатки, оба вида обитают совместно. Зимует тундряная куропатка также в горах, в тех же районах, что и летом, или перекочёвывает на несколько сотен метров ниже по склонам в высотную зону белой куропатки – на горные луга и в берёзовые криволесья.

По многократным наблюдениям автора на участках каменисто-лишайниковых тундр заповедника «Вишерский» тундряные куропатки в конце зимы (март) регулярно держались и кормились на обширных выдувах, лишённых сплошного снежного покрова. При наличии в горах плотного снега автором дважды в марте 2013 и 2015 гг. было отмечено целенаправленное сопровождение ими кочующих стад диких северных оленей и активные кормёжки куропаток на раскопанных копытными участках.

По данным ряда авторов, изучавших специфику территориального распределения белой и тундряной куропаток в местах их совместного обитания, отмеченные для Северного Урала особенности биотопической разобщённости этих видов характерны и для других значительно удалённых друг от друга районов России. Так, на трёх существенно отличающихся по физико-географическим особенностям и климату горных территориях Сибири и Дальнего Востока тундряные куропатки держатся в среднем несколько выше белых, часто на полностью открытых участках гор, лишённых кустарниковой растительности. Белые куропатки предпочитают расположенные ниже по склонам полуоткрытые угодья [Щербаков, Щербакова, 2011; Бисеров, 2016; Исаев, 2020].

Судя по локализации пунктов регистраций встреч белой и тундряной куропатки, в Басегах проявляется вышеописанная североуральская схема территориального распределения этих видов с поправками на малочисленность птиц и отсутствие оптимальных для обитания тундряной куропатки среднегорных плато с каменисто-лишайниковыми тундрами. Вся горная часть охраняемой территории заповедника «Басеги», на которой повсеместно преобладают кустарниковые и лесолуговые сообщества с вкраплениями скал, каменных осыпей и тундровой растительности, относится к характерным станциям белой куропатки. По имеющимся в научной картотеке данным, этот вид во время брачного и гнездового периодов отмечался на всех трёх горных массивах хр. Басеги (г. Северный, Средний и Южный Басег), а также на обширных участках верховых болот в лесном поясе (см. таблицу).

Горные биотопы, потенциально привлекательные для весенне-летнего обитания тундряной куропатки, имеют в Басегах островной характер и занимают небольшие площади. Встречи этого вида в бесснежное время года наиболее вероятны на россыпях курумников и на участках с горно-тундровой растительностью, расположенных в предвершинных частях г. Северный и Средний Басеги (850–950 м над ур. м.).

Многолетняя динамика встреч белых и тундряных куропаток на территории заповедника «Басеги»

Из 17 встреч куропаток двух видов, зарегистрированных в научной картотеке заповедника «Басеги» за период с 1988 по 2023 гг. (см. таблицу), более половины (9 случаев) имели место на южном склоне г. Северный Басег, в районе экологической тропы, которая чаще всего (десятьки раз за год) посещается сотрудниками ООПТ и организованными группами туристов. Там же были отмечены и обе примечательные находки самок этого вида с птенцами (см. таблицу). В первом случае (5.07.2011 и 11.07.2011), в типичном для белой куропатки лесо-лугово-кустарниковом биотопе подгольцовой зоны был дважды отмечен, вероятно, один и тот же выводок (самка с тремя птенцами). Во втором случае (29.06.2017), самка с двумя птенцами была встречена на каменных россыпях у вершины горы. То есть на участке возможного совместного обитания обоих видов куропаток. Обнаруженная и сфотографированная взрослая птица имела более характерное для белой куропатки рыжеватое оперение (наблюдатель В.А Акимов).

Регистрации куропаток на территории заповедника «Басеги» в 1984–2023 гг.

[Registration of partridges on the territory of the Basegi Reserve in 1984-2023]

Дата	Место наблюдения	Биотоп	Вид птицы	Кол-во, пол, возраст и поведение птиц
25.12.1986 (приводится по Наумкину, 2012)	Точно не указано	Вырубки охранной зоны	Белая куропатка	Не указано
25.05.1988	91 кв. Южный Басег	Не указан	Белая куропатка	1 самец, 1 самка
10.09.1997	24 кв. Усьв. леснич.	Дорога в лесной зоне от КПП Северный к лугам	Белая куропатка	1 особь, пол не опр., сидела на дороге
8.04.2006	24 кв. Усьв леснич. Склон г. Сев. Басег	Горная луговина с ивняком	Белая куропатка	1 самец, слетел из-под ив
28.10.2006	72 кв., отворот на 9 ветку	Дорога в лесной зоне, вырубки	Белая куропатка	10–15 особей, перелинявших в зимний наряд
21.05.2011 (приводится по Наумкину, 2012)	Верховое болото в лесном поясе в 0.5–1 км к юго-востоку от к. Счастливый	Сфагновое болото с островками леса и кустарников	Белая куропатка	1 самец, отмечен на слух, вокализация с расстояния несколько сотен метров. Голос птицы слышали с кордона (наблюдатель).
21.05.2011	Плато под вершиной г. Ср. Басег	Горная тундра с вкраплениями кустов и каменных осыпей	Белая куропатка	1 самец в брачном наряде
22.05.2011 (приводится по Наумкину, 2012)	Экотропа на г. Сев. Басег	Кустарники, луговины, горные тундры на границе подгольцового и горно-тундрового пояса	Белая куропатка	1 самец. При испугивании, улетел на восточный склон г. Северный Басег
22–25.05.2011 (приводится по Наумкину, 2012)	Горы Ср. и Сев. Басег, верховое болото в лесной зоне вблизи к. Счастливый	Точно не определено. Предположительно – лесолуговые и горно-тундровые участки гор и сфагновое болото с вкраплениями лесной и кустарниковой растительности в таёжной зоне	Белая куропатка	Ежедневная дальняя вокализация в сумерках не менее, чем трёх самцов, определённая издали, на слух без визуального контакта с птицами
11.07.2011	23 кв. Усьв. науч. стационар	Кустарники и луговины в подгольцовом поясе возле жилья	Белая куропатка	1 самка, 3 птенца Те же птицы отмечены 5.07.2011 у выхода экотропы
26.09.2011	Плато под Сев. Басегом возле экотр.	Кустарничковая тундра (черника) с вкраплениями кустов	Белая куропатка	2 самки, кормились на ягодах
29.06.2017	16 кв. Усьв. леснич. Восточный склон г. Сев. Басег	Каменные россыпи в подгольцовом поясе	Белая куропатка	3 особи: 1 самка и 2 птенца; отводила от птенцов. Имеется фото, взрослая птица на нём рыжеватого окраса.

Дата	Место наблюдения	Биотоп	Вид птицы	Кол-во, пол, возраст и поведение птиц
19.12.2017	21 кв. Усвь. леснич. Науч. стационар	Горный луг в подгольцовом поясе	Белая куропатка	2 особи: 1 самец, 1 самка
7.05.2021	109/77 кв. в 2 - 3 км от р. Б. Басег	Дорога в лесной зоне, вырубки	Белая куропатка	1 самка, пёстрая окраска, сидела на обочине.
4.06.2021	Южный склон г. Ср. Басег перед останцами	Лесотундра (криволесья с уч. тундр и осыпей	Белая куропатка	1 самец в брачном наряде
5.01.2021	Спуск дороги к Б. Басегу	Дорога в лесной зоне, вырубки	Белая куропатка	1 особь, взлетела перед идущим снегоходом
29.10.2022	Гребень г. Сев. Басег в районе экотропы	Чередование осыпей с участками тундры и криволесья	Указана белая куропатка, возможны оба вида	3-4 особи, с пестринами зимней линьки, кормились на чернике
13.03.2022	20 кв. Усвь. леснич. Выход дороги от к. Счастливого на горные луга	Граница леса и лугов у южного склона г. Сев. Басег	Указана белая куропатка, возможны оба вида	Следы птиц на кормёжке у дороги
25.02.2023	10 кв. Усвь. леснич., науч. стационар	Горные луга и кустарники	Указана белая куропатка, возможны оба вида	Следы птиц на кормёжке
14.05.2023	Экотропа на Сев. Басег, при подъёме к вершине	Скальник с островками тундр. растительности, кам. осыпей и горных криволесий	Тундряная куропатка	1 самка, 4 самца в брачном наряде. Токовое поведение. Имеется фото самца в брачном наряде
23.09.2023	Экотропа на Сев. Басег в 300 м от вершины	Скальник с островками тундр. растительности, кам. осыпей и горных криволесий	Тундряная куропатка	1 особь, самец в процессе линьки в зимний наряд (70% белого пера) с формирующейся чёрной "уздечкой" между глазом и клювом. Имеется видео и фото

На г. Средний Басег, которая посещается сотрудниками заповедника достаточно регулярно, но значительно реже, чем прилегающий к экологической тропе склон Северного Басега, отмечены две встречи белых куропаток. Оба раза это были весенние регистрации одиночных самцов в брачном наряде.

На г. Южный Басег, где полевые маршрутные наблюдения проводятся ещё реже, за 35 лет отмечена всего одна встреча пары белых куропаток.

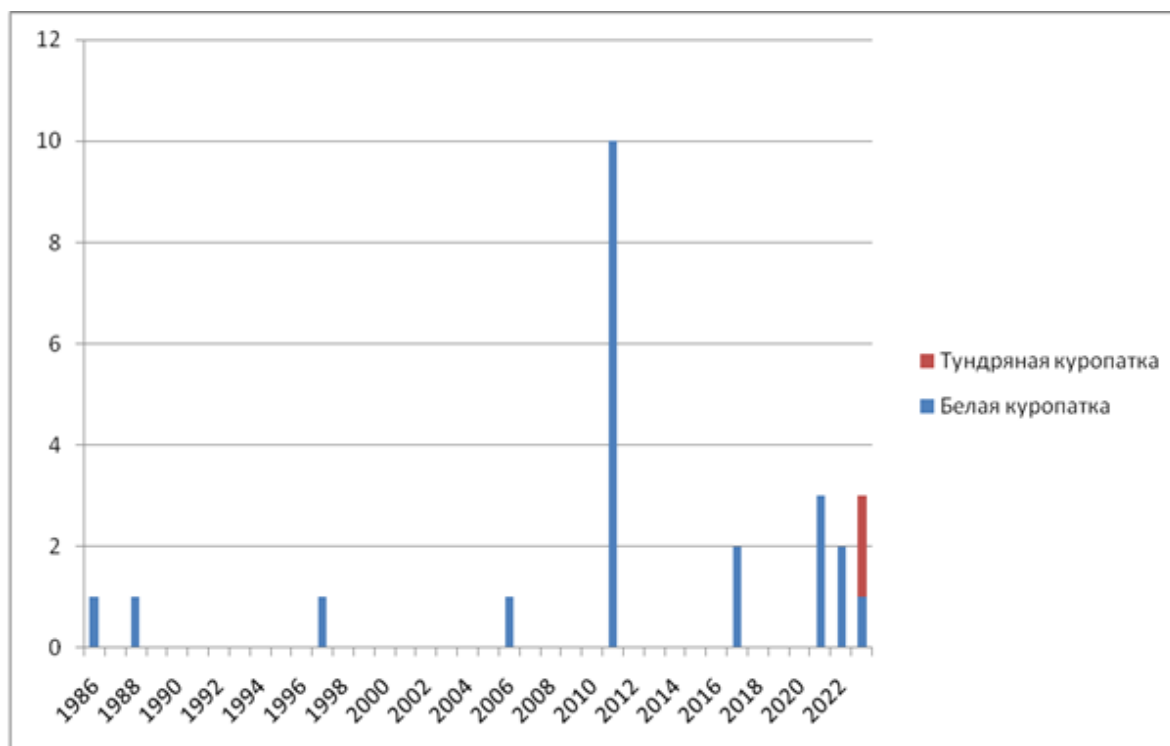
Четыре регистрации этих птиц, произошедшие на лесных дорогах при подъездах на авто-мото транспорте к основному горному узлу заповедной территории, иллюстрируют характерные для данного вида дальние сезонные кочёвки (см. таблицу).

Дополнив представленные данные научной картотеки заповедника несколькими неучтёнными в ней наблюдениями белой куропатки, имевшими место в разные годы (приводятся в таблице по Наумкину [2012]), можно сделать вывод о том, что за всё время существования ООПТ (1982–2023 гг.) эту птицу в Басегах визуально и на слух регистрировали не менее 20 раз. Указание точного числа встреч не представляется возможным из-за того, что часть регистраций была осуществлена на слух с дальнего расстояния без визуального контакта с птицами и по следам на снегу (у тундряной и белой куропаток они неотличимы) (см. таблицу). Во время планового обследования сопредельных с данной ООПТ районов 11.07.2004 пребывание белой куропатки было также отмечено на г. Ослянке в 20 км к северу от г. Северный Басег (устное сообщение Н.М. Лоскутовой).

Тундряная куропатка за тот же период времени была достоверно зарегистрирована в заповеднике два раза: 14.05.2023 на экологической тропе при подъёме на вершину г. Северный Басег (наблюдатели Е.М. Ульянова, Н.А. Ляпина) и 23.09.2023 в том же районе (наблюдатель Ю.В. Мингазова) (таблица).

На рисунке показана многолетняя динамика частоты регистраций двух видов куропаток в заповеднике «Басеги». С момента первой находки белой куропатки (1986) до 2011 г. встречи этих птиц на ООПТ были единичными и перемежались продолжительными (до 9 лет) перерывами. В период с 2011 по 2020 гг. белая куропатка встречалась на охраняемой территории заметно чаще. Многолетние периоды отсутствия её регистраций сократились до 3–5 лет. Наиболее результативным в плане наблюдений за этим видом оказался 2011 г., когда было отмечено до десяти встреч с этими птицами (большой частью на слух) и впервые зарегистрирован случай успешного выведения потомства. В последние три года (2021–

2023) регистрации белых куропаток стали ежегодными, а в 2023 г. появились первые достоверные наблюдения и тундряной куропатки.



Число регистраций белой и тундряной куропаток на территории заповедника «Басеги» по годам наблюдений с 1984 по 2023

[The number of registrations of white and tundra partridges on the territory of the Basegi Nature Reserve by observation years from 1984 to 2023]

Заключение

Белая и тундряная куропатки входят в современный список видов птиц заповедника «Басеги».

Белая куропатка является на данной ООПТ редким, малочисленным, периодически гнездящимся видом. Возможно, в незначительном количестве она обитает в заповеднике постоянно или, что более вероятно, периодически подкочёвывает с более северных участков Уральских гор, оставаясь на время гнездования и выведения потомства. В бесснежное время года эта птица встречается в Басегах в типичном для неё спектре низкогорных биотопов, включающем горные тундры, лесолуговые и кустарниковые растительные сообщества подгольцового пояса на предвершинных участках и склонах гор в диапазоне высот 700–950 м над ур. м., а также обширные верховые болота в лесной зоне.

Статус пребывания в заповеднике «Басеги» тундряной куропатки, достоверно зарегистрированной за 40 лет наблюдений только дважды (в мае и сентябре 2023 г.), в настоящее время неясен и требует уточнения.

В последнее время отмечен определённый положительный тренд в освоении белой и тундряной куропатками крайней южной границы своего естественного ареала на западном макросклоне Урала. Эта тенденция проявляется в заметном росте числа регистраций белой куропатки и первых случаях обнаружения тундряных куропаток на территории заповедника «Басеги» в 2021–2023 гг.

Список источников

1. Бисеров М.Ф. Особенности распространения белой *Lagopus lagopus* и тундряной *L. mutus* куропаток в высокогорьях Буреинского заповедника // Русский орнитологический журнал. 2016. Т. 25, экспресс-выпуск № 1280. С. 1565–1571.

2. Бояршинов В.Д., Адиев М.Я. Численность тетеревиных птиц и ее динамика в заповеднике «Басеги» // Природные ресурсы Западно-Уральского Нечерноземья, их рациональное использование и охрана. Пермь, 1995. С. 42–46.

3. Бояршинов В.Д., Делидова Н.В. Размножение и численность тетеревиных птиц в заповеднике «Басеги» // Гнездовая жизнь птиц. Пермь, 1989. С. 62–65.

4. Исаев А.П. Белая *Lagopus lagopus* и тундряная *L. mutus* куропатки в местах совместного обитания (на примере Центрального Верхоянья) // Русский орнитологический журнал. 2020. Т. 29, экспресс-выпуск № 1882. С. 479–486.
5. Казаков В.П. Дополнительные сведения по орнитофауне окрестностей Перми // Материалы к распространению птиц на Урале, в Приуралье и Западной Сибири. Екатеринбург, 2001. С. 85–87.
6. Колбин В.А., Семенов В.В. Редкие птицы бассейна реки Вишеры // Заповедник «Вишерский»: итоги и перспективы исследований (15 лет со дня основания). Пермь, 2006. С. 122–124.
7. Курулюк В.М. Динамика численности тетеревиных в заповеднике «Басеги» за 1982–1996 гг. // Экологические основы стабильного развития Прикамья. Пермь, 2000. С. 172–173.
8. Курулюк В.М., Наумкин Д.В. Динамика численности и некоторые особенности биологии тетеревиных птиц (Tetraonidae) в заповеднике «Басеги» // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2014. Вып. 3. С. 27–32.
9. Курулюк В.М., Наумкин Д.В. Динамика численности тетеревиных птиц (Tetraonidae) в заповеднике «Басеги» (Пермский край) в 2001–2011 годах // Человек и природа – взаимодействие на особо охраняемых природных территориях: материалы межрег. науч.-практ. конф. Горно-Алтайск, 2014. С. 121–126.
10. Наумкин Д.В. Белая куропатка в заповеднике «Басеги» // Труды ГПЗ «Басеги». 2012. Вып. 2. С. 141–142.
11. Рябицев В.К. Птицы Урала, Предуралья и Западной Сибири. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2008. 634 с.
12. Семенов В.В. Результаты весенних учетов белой и тундряной куропаток в горах Вишерского заповедника // Особо охраняемые природные территории в жизни региона. Пермь, 2011. С. 118–119.
13. Щербаков Б.В., Щербакова Л.И. Белая *Lagopus lagopus* и тундряная *L. mutus* куропатки в высокогорье Западного Алтая // Русский орнитологический журнал. 2011. Т. 20, экспресс-выпуск № 631. С. 277–284.

References

1. Biserov M.F. [Peculiarities of distribution of white *Lagopus lagopus* and tundra *L. mutus* partridges in the highlands of the Bureinsky Reserve]. *Russkij ornitologičeskij žurnal*. V. 25, Express iss. No. 1280 (2016): pp. 1565-1571. (In Russ.).
2. Boyarshinov V.D., Adiev M.Ya. [The number of grouse birds and its dynamics in the Basegi Reserve]. *Prirodnye resursy Zapadno-Ural'skogo Nečernozem'ja, ich racional'noe ispol'zovanie i ochrana* [Natural resources of the West Ural Non-Chernozem region, their rational use and protection]. Perm, 1995, pp. 42-46. (In Russ.).
3. Boyarshinov V.D., Delidova N.V. [Reproduction and abundance of grouse birds in the reserve "Basegi"]. *Gnezdovalja žizn' ptic* [Nesting life of birds]. Perm, 1989, pp. 62-65. (In Russ.).
4. Isaev A.P. [White *Lagopus lagopus* and tundra *L. mutus* partridges in places of joint habitat (on the example of the Central Verkhoyansk region)]. *Russkij ornitologičeskij žurnal*. V. 29, Express iss. No. 1882 (2020): pp. 479-486. (In Russ.).
5. Kazakov V.P. [Additional information on the avifauna of the surrounding area Perm]. *Materialy k rasprostranjeniju ptic na Urale. v Priural'e i Zapadnoj Sibiri* [Materials for the distribution of birds in the Urals, in the Urals and Western Siberia]. Yekaterinburg, 2001, pp. 85-87. (In Russ.).
6. Kolbin V.A., Semenov V.V. [Rare birds of the Vishera River basin]. *Zapovednik "Višerskij: itogi i perspekyivy issledovanij Vishersky* [Nature Reserve: results and prospects of research (15 years since its foundation)]. Perm, 2006, pp. 122-124. (In Russ.).
7. Kurulyuk V.M. [Dynamics of the number of grouse in the reserve "Basegi" for 1982-1996]. *Èkologičeskie osnovy stabil'nogo razvitija Prikam'ja* [Ecological foundations of stable development of the Kama region]. Perm, 2000, pp. 172-173. (In Russ.).
8. Kurulyuk V.M., Naumkin D.V. [Population dynamics and some features of biology of grouse birds (Tetraonidae) in the reserve "Basegi"]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 3 (2014): pp. 27-32. (In Russ.).
9. Kurulyuk V.M., Naumkin D.V. [Dynamics of the number of grouse birds (Tetraonidae) in the Basegi Nature Reserve (Perm Krai) in 2001-2011]. *Čelovek i priroda – vzaimodejstvie na osobo ochranjaemych prirodnyh territorijach* [Man and nature – interaction in specially protected natural territories: Materials interreg. scientific-practical. conf., dedicated to the 25th anniversary of the creation of the Shor National Park]. Gorno-Altaysk, 2014, pp. 121-126. (In Russ.).
10. Naumkin D.V. [White partridge in the reserve "Basegi"]. *Trudy gosudarstvennogo zapovednika Basegi*. Iss. 2 (2012): pp. 141-142. (In Russ.).
11. Ryabitsev V.K. *Pticy Urala, Predural'ja i Zapadnoj Sibiri* [Birds of the Urals, the Urals and Western Siberia]. Yekaterinburg, Izdatel'stvo Ural'skogo universiteta Publ., 2008. 634 p. (In Russ.).

12. Semenov V.V. [Results of spring surveys of white and tundra partridges in the mountains of the Vishersky Reserve]. *Osobo ochranjaemye prirodnye territorii v žizni regiona* [Specially protected natural territories in the life of the region]. Perm, 2011, pp. 118-119. (In Russ.).

13. Shcherbakov B.V., Shcherbakova L.I. [White *Lagopus lagopus* and tundra *L. mutus* partridges in the highlands of the Western Altai]. *Russkij ornitologičeskij žurnal*. V. 20, Express iss. No. 631 (2011): pp. 277-284. (In Russ.).

Статья поступила в редакцию 17.10.2023; одобрена после рецензирования 02.11.2023; принята к публикации 20.11.2023.

The article was submitted 17.10.2023; approved after reviewing 02.11.2023; accepted for publication 20.11.2023.

Информация об авторе

В. В. Семенов – канд. геогр. наук, научный сотрудник.

Information about the author

V. V. Semenov – candidate of geographical sciences, Researcher.

ЗООЛОГИЯ

Краткое сообщение

УДК 595.624

doi: 10.17072/1994-9952-2023-4-323-327

**Первая находка *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1958)
(Chilopoda: Scutigermorpha, Scutigeridae) в Пермском крае
(Средний Урал)**

Гюлли Шамсадин кызы Фарзалиева^{1✉}, Надежда Борисовна Овчанкова²,
Юрий Вячеславович Дьячков³

^{1,2} Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

³ Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия, dyachkov793@mail.ru

^{1✉} fgsh@psu.ru

² nephilain@gmail.com

Аннотация. Многоножка-мухоловка *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) имеет космополитный ареал благодаря синантропной интродукции. В России этот вид встречается в Европейской части и в Сибири. На Урале подтвержденные находки *S. coleoptrata* до настоящего времени ограничивались южной частью региона. Ранее опубликованная заметка о нахождении этого вида в Пермском крае [Козьминых, 2016] была основана лишь на устном сообщении третьего лица. Здесь приведены первые подтвержденные сведения об обнаружении *S. coleoptrata* в Пермском крае. Находки были сделаны в жилом доме (г. Пермь). Помимо взрослых мухоловок, в месте сбора были замечены ювенильные особи. Приводятся фотографии морфологических структур, подтверждающие правильность идентификации вида.

Ключевые слова: фауна, Пермский край, многоножка-мухоловка, новая находка, *Scutigera coleoptrata*

Для цитирования: Фарзалиева Г. Ш. Овчанкова Н. Б., Дьячков Ю. В. Первая находка *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1958) (Chilopoda: Scutigermorpha, Scutigeridae) в Пермском Крае (Средний Урал) // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 4. С. 323–327. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-323-327>.

Благодарности: мы выражаем благодарность И.Н. Истоминой за предоставленный материал. Исследование Ю.В. Дьячкова выполнено в рамках проекта FZMW-2023-0006 «Эндемичные, локальные и инвазивные членистоногие животные (Arthropoda) гор Южной Сибири и Центральной Азии: уникальный генфонд горячей точки биоразнообразия» государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации.

ZOOLOGY

Short message

The first record of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1958) (Chilopoda: Scutigermorpha, Scutigeridae) in the Perm Krai (Middle Urals)

Gyulli Sh. Farzalieva^{1✉}, Nadezda B. Ovchankova², Yurii V. Dyachkov³

^{1,2} Perm State University, Perm, Russia

³ Altai State University, Barnaul, Russia, dyachkov793@mail.ru

^{1✉} fgsh@psu.ru

² nephilain@gmail.com

Abstract. The house centipede *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) has a cosmopolitan range due to anthropogenic introduction. In Russia, this species is found in the European part and Siberia, while in the Urals, the confirmed records have so far been limited to the southern part of the region. A previously published record about the presence of this species in the Perm Krai [Kozminykh, 2016] was based only on the personal comment by a third person. The first confirmed data on the occurrence of the house centipede *S. coleoptrata* in the Perm Krai is provided. All records were made in anthropogenic habitats in the city of Perm. In addition to adult specimens, juveniles were also spotted at the collection site. Images of morphological features to confirm the species identification are given.

Keywords: fauna, Perm Krai, house centipede, new records, *Scutigera coleoptrata*

For citacion: Farzalieva G. Sh., Ovchankova N. B., Dyachkov Yu. V. [The first record of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1958) (Chilopoda: Scutigeraomorpha, Scutigeraidae) in the Perm Krai (Middle Urals)]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2023): pp. 323-327. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-323-327>.

Acknowledgments we are grateful to I.N. Istomina for providing material. The study of Yu.V. Dyachkov was funded by state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project FZMW-2023-0006 “Endemic, local and invasive arthropods (Arthropoda) of the mountains of South Siberia and Central Asia: a unique gene pool of a biodiversity hotspot”).

Семейство многоножек-мухоловок Scutigeraidae включает подсемейство Thereuoneminae Verhoeff, 1905, распространенное в основном в Азии и Австралийской области [Edgecombe, 2011], и подсемейство Scutigerae Leach, 1814. Представители последнего отмечены почти на всех континентах, на многих крупных островах и океанических архипелагах [Bonato, Zapparoli, 2011], благодаря синантропной интродукции самой известной из мухоловок – *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758).

На Урале и в Приуралье подтвержденные находки *S. coleoptrata* до настоящего времени отмечались только в южной части региона [Фарзалиева, 2008, 2009; Khabibullin, 2017]. Указание этого вида для Пермского края [Козьминых, 2016] базируется лишь на устном сообщении третьего лица, о чем автор статьи упомянул в тексте. Следует отметить, что для достоверной идентификации мухоловок визуальной оценки недостаточно, необходимо детальное изучение морфологии с использованием оптического увеличения. Кроме того, на прилегающей к Уралу территории Средней Азии обнаружены мухоловки из подсемейства Thereuoneminae [Dyachkov, 2020; неопубликованные данные], которые габитуально сходны со *S. coleoptrata*, и отличаются от нее (а также от всех представителей подсемейства Scutigerae) отсутствием пары шипов ("spine bristles") на дистальном конце лапки I на ногах 6–14 пар [Edgecombe, 2011] (рис. 3–4).

Цель этой краткой фаунистической заметки – зафиксировать новую находку *Scutigera coleoptrata* в Пермском крае с подтверждающими определением иллюстрациями (рис. 1–4).

Материал был собран И.Н. Истоминой в жилом многоквартирном доме (г. Пермь) и в засушенном виде передан на хранение в коллекцию многоножек Пермского государственного национального исследовательского университета. Фотографии получены Г.Ш. Фарзалиевой при помощи фотокамеры Olympus OMD EM-10 с объективом M. Zuiko Digital ED 60 mm f/2.8 в ведущей лаборатории микробных и клеточных технологий биологического факультета ПГНИУ (Пермь). После фотографирования материал был размягчен в эксикаторе и помещен для хранения в 70%-ный раствор этилового спирта.

Результаты

Отр. **Scutigeraomorpha** Росоок, 1895

Сем. **Scutigeraidae** Gervais, 1837

Scutigera coleoptrata (Linnaeus, 1758)

Материал: 1 самец, 1 самка (PSU-1318), Россия, Средний Урал, Пермский край, г. Пермь, многоквартирный жилой дом, 58°01'03.2"N, 56°17'02.4"E, август 2019 г., И.Н. Истомина.

Распространение: вид встречается на Канарских и Азорских островах, Диких островах, островах Кабо-Верде, Гибралтаре, в материковой части Португалии и Испании, на Мадейре, Балеарских островах, в материковой Греции, включая острова, Албании, на Кипре, материковой Франции (включая Корсику), материковой Италии (включая Сардинию и Сицилию), на Мальте, в Сан-Марино, Монако, Германии, Австрии, Чехии, Словакии, Швейцарии, Словении, Северной Македонии, Сербии, Хорватии, Черногории, Боснии и Герцеговине, Болгарии, Венгрии, Румынии, Украине, Беларуси, Эстонии, Дании, Финляндии, Великобритании (включая Нормандские острова), Азербайджане, Грузии, Турции, Сирии, Ливане, Палестине, Израиле, Иордании, Ираке, Иране, Туркменистане, а также Марокко, Алжире, Тунисе, Ливии и Египте. Вид интродуцирован в Эфиопскую область (Камерун, о. Святой Елены, Ангола, Кения, Танзания, Малави, Мозамбик, Зимбабве, Южная Африка), восточную часть Палеарктики (Япония и Южная Корея), Индо-Малайскую область (Тайвань и Вьетнам), Австралийскую область (Австралия (включая Тасманию), Новая Зеландия), Неарктику (о. Св. Давида, США и Канада) и Неотропическую область (Мексика, Гватемала, Уругвай, Аргентина и Чили). Присутствие вида в Андорре, Лихтенштейне и Ватикане нуждается в проверке [Lewis, 1981; Stoev, Geoffroy, 2004; Faúndez, 2011; Волкова, 2014; Ostrovsky, 2016; Khabibullin, 2017]. В России вид встречается в европейской части (Ульяновская и Пензенская обл., Ставропольский край, Республика Дагестан), на Урале (Республика Башкортостан, Пермский край, Оренбургская обл.) и в Сибири (Кемеровская и Новосибирская обл., Алтайский край, Республика Алтай) [Фарзалиева, 2008, 2009; Волкова, 2014; Zuev, 2016; Nefediev et al., 2016; Dyachkov, Zuev, Gichikhanova, 2022]. Таким образом, в настоящее время ареал вида можно охарактеризовать как космополитный.



Рис. 1–2. Габитус *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758), дорсально: 1 – самец, 2 – самка. Масштаб: 5 мм
 [Habitus of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758), dorsally: 1 – male, 2 – female. Scale bar: 5 mm]

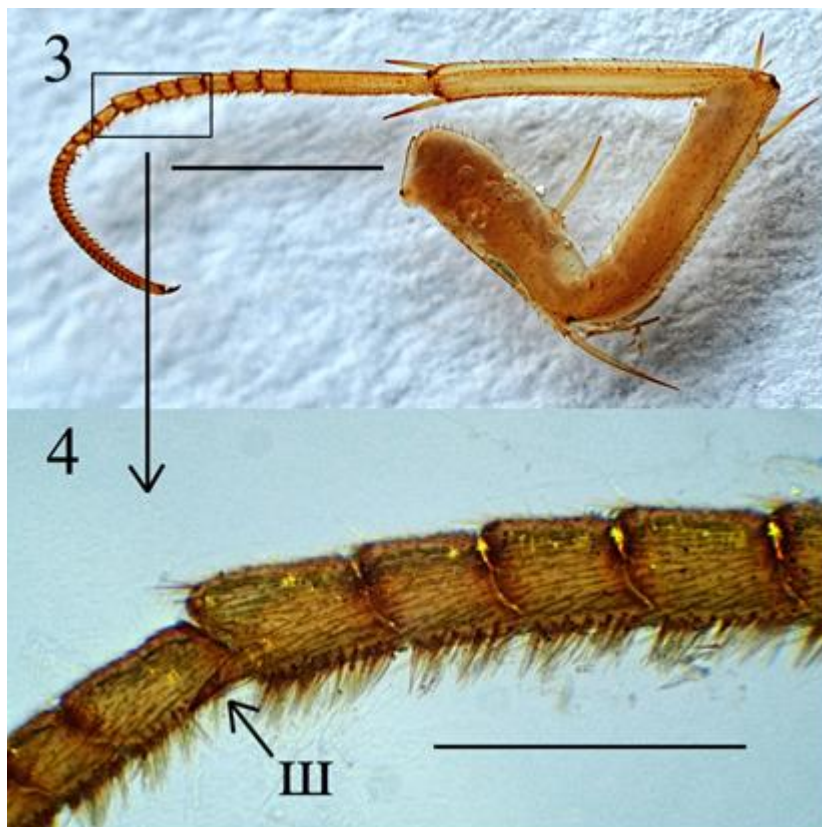


Рис. 3–4. Нога седьмой пары *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758), латерально: 3 – общий вид; 4 – дистальный конец лапки I. Аббревиатура: ш – шип. Масштаб: 2 мм (3), 0.5 мм (4)
 [Leg of the seventh pair of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758), laterally: 3 – total view; 4 – distal part of tarsus I. Abbreviation: ш – spine. Scale: 2 mm (3), 0.5 mm (4)]

Заклучение

Мухоловка *Scutigera coleoptrata* указывается впервые для Среднего Урала и Приуралья. Помимо взрослых мухоловок, в месте сбора были замечены ювенильные особи (устное сообщение сборщика), что может свидетельствовать о существовании воспроизводимой популяции этого вида в Пермском крае.

Список источников

1. Волкова Ю.С. Фауна хищных многоножек (Chilopoda) Ульяновской области // Природа Симбирского Поволжья: сб. науч. тр. XVI межрегион. науч.-практ. конф. Ульяновск, 2014. Вып. 15. С. 95–103.
2. Козьминых В.О. Находка мухоловки *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) (Chilopoda: Scutigero-morpha: Scutigerae) в Пермском крае // Естественные и математические науки в современном мире. 2016. Т. 10, № 45. С. 14–17.
3. Фарзалиева Г.Ш. Фауна и хорология многоножек (Myriapoda) Урала и Приуралья: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2008. 24 с.
4. Фарзалиева Г.Ш. Определитель многоножек (Myriapoda) Урала и Приуралья // Вестник Пермского университета. 2009. Вып. 10 (36). Биология. С. 66–72.
5. Bonato L., Zapparoli M. Chilopoda – Geographical distribution // Treatise on zoology – anatomy, taxonomy, biology. The Myriapoda / ed. A. Minelli. Leiden-Boston, Brill, 2011. Vol. 1. P. 327–337.
6. Dyachkov Yu.V. New data on the scutigero-morph and scolopendromorph centipedes (Chilopoda: Scutigero-morpha: Scutigerae; Scolopendromorpha: Scolopendridae, Cryptopidae) from Kazakhstan // Arthropoda Selecta. 2020. Vol. 29, № 2. P. 173–184. doi: 10.15298/arthsel.29.2.02.
7. Dyachkov Yu.V., Zuev R.V., Gichikhanova U.A. Centipedes (Chilopoda) from the Dagestan, northern Caucasus, Russia // Ecologica Montenegrina. 2022. Vol. 52. P. 568–589. doi:10.37828/em.2022.52.10.
8. Edgecombe G. Chilopoda – Taxonomic overview. Order Scutigero-morpha // Minelli A. (ed.). Treatise on zoology – anatomy, taxonomy, biology. The Myriapoda. Vol. 1. Leiden-Boston, Brill, 2011. P. 363–370.
9. Faúndez E.I. On the presence of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) (Chilopoda: Scutigero-morpha: Scutigerae) in the Metropolitan Region, Chile // Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa. 2011. Vol. 49. P. 336.
10. Khabibullin V.F. First records of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) (Chilopoda: Scutigero-morpha: Scutigerae) for Bashkortostan, the South Urals, Russia // Euroasian Entomological Journal. 2017. Vol. 16, № 4. P. 390–391.
11. Lewis J.G.E. The Biology of Centipedes. Cambridge-New York: Cambridge University Press, 1981. 476 p.
12. Merzlikin I.R. House centipede *Scutigera coleoptrata* in Ukraine: a rare species becomes an ordinary synanthropic one // Invasion of alien species in the Holarctic. The IV International Symposium. 2013. P. 117.
13. Nefediev P.S. et al. First record of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) in the south of Western Siberia, Russia (Chilopoda: Scutigero-morpha: Scutigerae) // Biological Bulletin of the Bogdan Chmelniyskiy Melitopol State Pedagogical University. 2016. Vol. 1. P. 428–432. doi:10.15421/201626.
14. Ostrovsky A.M. The first records of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) (Chilopoda: Scutigero-morpha: Scutigerae) from Belarus // Arthropoda Selecta. 2016. Vol. 25, № 4. P. 355–356. doi:10.15298/arthsel.25.4.02.
15. Stoev P., Geoffroy J.-J. An annotated catalogue of the scutigero-morph centipedes in the collection of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (France) (Chilopoda: Scutigero-morpha) // Zootaxa. 2004. Vol. 635. P. 1–12.
16. Zuev R.V. Centipedes (Chilopoda) from the Stavropol Territory, northern Caucasus, Russia // Arthropoda Selecta. 2016. Vol. 25, № 1. P. 23–38. doi:10.15298/arthsel.25.1.03.

References

1. Volkova Yu.S. [Fauna of centipedes (Chilopoda) of the Ulyanovsk Region]. *Priroda Simbirskogo Povolž'ya* [The nature of the Simbirsk Volga region. Collection of scientific works of the XVI interregional scientific and practical conference]. Ulyanovsk, 2014, Iss. 15, pp. 95-103. (In Russ.).
2. Kozminikh V.O. [Record of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) (Chilopoda: Scutigero-morpha: Scutigerae) in the Perm Region]. *Estestvennye i matematičeskie nauki v sovremennom mire*. V. 10, No. 45 (2016): pp. 14-17. (In Russ.).
3. Farzalieva G.Sh. *Fauna i chorologija mnogonožek (Myriapoda) Urala i Priural'ja*. Avtoref. diss. kand. biol. nauk [Fauna and chorology of myriapods (Myriapoda) of the Urals and Cisuralia. Abstract Cand. Diss.]. Moscow, 2008. 24 p. (In Russ.).
4. Farzalieva G.Sh. [Identification keys for myriapods (Myriapoda) of the Urals and Cisuralia]. *Bulletin of Perm University*. Iss. 10(36). Biology (2009): pp. 66-72. (In Russ.).

5. Bonato L., Zapparoli M. Chilopoda – Geographical distribution. In: Minelli A. (ed.). Treatise on zoology – anatomy, taxonomy, biology. The Myriapoda. V. 1. Leiden-Boston, Brill, 2011, pp. 327-337.
6. Dyachkov Yu.V. New data on the scutigermorph and scolopendromorph centipedes (Chilopoda: Scutigermorpha: Scutigerae; Scolopendromorpha: Scolopendridae, Cryptopidae) from Kazakhstan. *Arthropoda Selecta*, V. 29, No. 2 (2020): pp. 173-184. doi: 10.15298/arthsel.29.2.02.
7. Dyachkov Yu.V., Zuev R.V., Gichikhanova U.A. Centipedes (Chilopoda) from the Dagestan, northern Caucasus, Russia. *Ecologica Montenegrina*. V. 52 (2022): pp. 568-589. doi:10.37828/em.2022.52.10.
8. Edgecombe G. Chilopoda – Taxonomic overview. Order Scutigermorpha. In: Minelli A. (ed.). Treatise on zoology – anatomy, taxonomy, biology. The Myriapoda. V. 1. Leiden-Boston, Brill, 2011, pp. 363-370.
9. Faúndez E.I. On the presence of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) (Chilopoda: Scutigermorpha: Scutigerae) in the Metropolitan Region, Chile. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*. V. 49 (2011): p. 336.
10. Khabibullin V.F. First records of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) (Chilopoda: Scutigermorpha: Scutigerae) for Bashkortostan, the South Urals, Russia. *Euroasian Entomological Journal*. V. 16, No. 4 (2017): pp. 390-391.
11. Lewis J.G.E. The Biology of Centipedes. Cambridge-New York, Cambridge University Press, 1981. 476 p.
12. Merzlikin I.R. House centipede *Scutigera coleoptrata* in Ukraine: a rare species becomes an ordinary synanthropic one. In: Invasion of alien species in the Holarctic. The IV International Symposium. 2013, p. 117.
13. Nefediev P.S., Tuf I.H., Dyachkov Yu.V., Efimov D.A. First record of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) in the south of Western Siberia, Russia (Chilopoda: Scutigermorpha: Scutigerae). *Biological Bulletin of the Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University*. V. 1 (2016): pp. 428-432. doi:10.15421/201626.
14. Ostrovsky A.M. The first records of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) (Chilopoda: Scutigermorpha: Scutigerae) from Belarus. *Arthropoda Selecta*. V. 25, No. 4 (2016): pp. 355-356. doi:10.15298/arthsel.25.4.02.
15. Stoev P., Geoffroy J.-J. An annotated catalogue of the scutigermorph centipedes in the collection of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (France) (Chilopoda: Scutigermorpha). *Zootaxa*. V. 635 (2004): pp. 1-12.
16. Zuev R.V. Centipedes (Chilopoda) from the Stavropol Territory, northern Caucasus, Russia. *Arthropoda Selecta*. V. 25, No. 1 (2016): pp. 23-38. doi:10.15298/arthsel.25.1.03.

Статья поступила в редакцию 24.10.2023; одобрена после рецензирования 30.10.2023; принята к публикации 20.11.2023.

The article was submitted 24.10.2023; approved after reviewing 30.10.2023; accepted for publication 20.11.2023.

Информация об авторах

Г. Ш. Фарзалиева – канд. биол. наук, доцент кафедры зоологии беспозвоночных и водной экологии;
 Н. Б. Овчанкова – канд. биол. наук, доцент кафедры зоологии беспозвоночных и водной экологии;
 Ю. В. Дьячков – мл. науч. сотрудник научно-исследовательской лаборатории фундаментальной и прикладной зоологии.

Information about the authors

G. Sh. Farzalieva – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Invertebrate Zoology and Aquatic Ecology;
 N. B. Ovchankova – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Invertebrate Zoology and Aquatic Ecology;
 Yu. V. Dyachkov – Junior Researcher at the Research Laboratory of Fundamental and Applied Zoology.

Вклад авторов:

Фарзалиева Г. Ш. – концепция исследования, написание основного текста, обработка полевого материала, создание фотографий.
 Овчанкова Н. Б. – изучение литературных источников, оформление первого варианта текста, обработка полевого материала.
 Дьячков Ю. В. – изучение литературных источников, оформление окончательного варианта текста, редактирование фотографий.

Contribution of the authors:

Farzalieva G. Sh. – research concept, text design, processing of field material.
 Ovchankova N. B. – study of literary sources, design of the first version of the text, processing of field material.
 Dyachkov Yu. V. – study of literary sources, design of final draft, editing of illustrations.

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.873.6:51-76:531

doi: 10.17072/1994-9952-2023-4-328-336

Интенсификация процесса биодеструкции ибупрофена с использованием факторного анализа и кинетического моделирования

Григорий Андреевич Бажутин^{1, 2}, Елена Александровна Тюмина^{3, 4},
Александр Анатольевич Селянинов⁵, Елена Владимировна Вихарева^{6, 7}✉

^{1, 3, 6} Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия

^{2, 4} Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

⁵ Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия,
prof.selyaninov@yandex.ru

⁷✉ Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь, Россия, ajm@perm.ru

¹ sniffedbybadger@gmail.com

³ elenatyumina@mail.ru

Аннотация. Ибупрофен – один из наиболее часто детектируемых фармполлютантов в сточных водах очистных сооружений многих стран. В ранее проведенных исследованиях подобраны условия актинобактериальной деструкции ибупрофена и разработана методика хроматографического анализа, позволяющая определять остаточные количества вещества в процессе биодеструкции. Однако влияние комплекса взаимодействующих факторов на динамику процесса биодеструкции ибупрофена изучено недостаточно. Цель настоящей работы – интенсификация этого процесса на основе многофакторного эксперимента с использованием управляемых параметров ключевых факторов, а также прогноз изменения содержания данного вещества и времени окончания оптимизированного процесса с применением кинетического моделирования. Варьирование концентраций глюкозы, *n*-гексадекана, инокулята и значения pH позволило уменьшить продолжительность процесса биодеструкции ибупрофена (0.1 г/л) с 10 до 2 сут. при использовании косубстратов в количестве 1.0 г/л, 10.0 мл/л и стандарта мутности БАК-5 соответственно, а также стабилизации pH на уровне 6.5. С использованием кинетического уравнения минус первого порядка $dx/dt = -k x^{-1}$ определены значения параметра *k* скорости процесса биодеструкции ибупрофена $138.88 \div 146.84\% / \text{ч}$, период полураспада $t_{1/2} = 25.54 \div 27.00$ ч и уточнено время окончания процесса $t_{1/100} = 34.05 \div 36.00$ ч в оптимизированных условиях.

Ключевые слова: ибупрофен, актинобактерии, *Rhodococcus*, биодеструкция, факторный анализ, кинетическое моделирование

Для цитирования: Интенсификация процесса биодеструкции ибупрофена с использованием факторного анализа и кинетического моделирования / Г. А. Бажутин, Е. А. Тюмина, А. А. Селянинов, Е. В. Вихарева // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 4. С. 328–336. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-328-336>.

Благодарности: исследование поддержано грантом РФФ № 21-14-00132.

MICROBIOLOGY

Original article

Enhancing the biodegradation of ibuprofen through factor analysis and kinetic modeling

Grigory A. Bazhutin^{1, 2}, Elena A. Tyumina^{3, 4}, Alexander A. Selyaninov⁵,
Elena V. Vihareva^{6, 7}✉

^{1, 3, 6} Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

^{2, 4} Perm State University, Perm, Russia

⁵ Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia, prof.selyaninov@yandex.ru

⁷✉ Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia, ajm@perm.ru

¹ sniffedbybadger@gmail.com

³ elenatyumina@mail.ru

Abstract. Ibuprofen ranks as one of the most frequently detected pharmaceutical pollutants in water across many countries. Previous studies identified conditions for actinobacterial degradation of ibuprofen and devel-

oped a chromatographic analysis technique, enabling the measurement of residual ibuprofen levels during biodegradation. However, the impact of a complex interplay of factors on the dynamics of ibuprofen biodegradation remains insufficiently explored. The objective of this study was to enhance the biodegradation process of ibuprofen through a multifactorial experiment that controlled key parameters and to predict changes in substance content and the time needed for process optimization using kinetic modeling. As a result of this study, varying the concentrations of glucose, n-hexadecane, inoculum, and pH values has enabled a remarkable reduction in the biodegradation process duration for ibuprofen (0.1 g/L), from 10 days to just 2 days when employing cosubstrates in quantities of 1.0 g/L, 10.0 ml/l, and adhering to the turbidity standard NTU-5, along with pH stabilization at 6.5. By applying the kinetic equation of the first-order derivative, $dx/dt = -k x^1$, we determined the parameter 'k' for the ibuprofen biodegradation rate to be $138.88 \div 146.84\%^2/h$. The half-life ($t_{1/2}$) was calculated as $25.54 \div 27.00$ hours, and the process's endpoint, $t_{1/100}$, was refined to $34.05 \div 36.00$ hours under the optimized conditions.

Keywords: ibuprofen, actinobacteria, *Rhodococcus*, biodestruction, factor analysis, kinetic modeling

For citation: Bazhutin G. A., Tyumina E. A., Selyaninov A. A., Vihareva E. V. [Enhancing the biodegradation of ibuprofen through factor analysis and kinetic modeling]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 4 (2023): pp. 328-336. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-328-336>.

Acknowledgments: the study was supported by the Russian Science Foundation grant № 21-14-00132.

Введение

Фармацевтические поллютанты, представляющие собой высокостабильные соединения с разнообразной химической структурой и выраженной биологической активностью, с начала 2000-х годов признаны новым классом ксенобиотиков [Patel et al., 2019]. Данные вещества оказывают неблагоприятное воздействие на окружающую среду даже в относительно невысоких, но экологически значимых концентрациях [Chopra, Kumar, 2020; Sánchez-Aceves et al., 2021]. Одними из многочисленных микроорганизмов, осуществляющих процессы естественного самоочищения окружающей среды от антропогенных ксенобиотиков, являются актинобактерии рода *Rhodococcus* – типичные обитатели водных и почвенных экосистем, отличающиеся наибольшим разнообразием деградируемых поллютантов [Ivshina, Kuyukina, Krivoruchko, 2017; Anteneh, Franco, 2019; Girardot et al., 2020]. Ранее нами была показана способность актинобактерий рода *Rhodococcus* к биологической деструкции лекарственных средств разной химической структуры и фармакологического действия, в том числе парацетамола, ацетилсалициловой кислоты, кодеина, дротаверина гидрохлорида, диклофенака натрия, мелоксикама, ибупрофена и др. [Ivshina et al., 2015, 2019, 2021].

Проведение процессов бактериальной деструкции лекарственных средств требует соблюдения многих условий, которые определяются влиянием комплекса фиксируемых на начальном этапе или регулируемых в ходе процесса факторов, основными из которых являются скорость вращения шейкера, температура процесса, концентрация бактериальных клеток, концентрация косубстратов (дополнительных источников углерода и энергии для микроорганизмов), концентрация фармпрепарата, установленная в зависимости от его минимальной подавляющей концентрации и др. Ранее в цикле исследований нами показано, что скорость уменьшения концентрации лекарственного средства в ходе процесса биодеструкции при фиксированных начальных условиях пропорциональна концентрации вещества в культуральной среде бактерий. Время окончания процесса деградации, критерием которого является полное удаление фармпрепарата из среды культивирования, составляло от нескольких часов до 30 сут. Динамика убыли количества вещества в процессе биодеструкции регистрировалась с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). При этом проводился подбор условий хроматографического определения фармвещества в специфической биожидкости – среде культивирования бактерий [Karpenko et al., 2014; Plotnikov et al., 2017; Khrenkov et al., 2020; Vihareva et al., 2023].

Нами установлено, что продолжительность процесса биодеструкции ибупрофена (ИБП) клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в фиксированных условиях составляла более 5 сут., при этом остаточная концентрация ИБП находилась на уровне 20% [Vihareva et al., 2023]. На основе работ [Сергиенко, Бондарева, 2000; Karpenko et al., 2014] была подтверждена случайность процесса биодеструкции ИБП с позиций стохастического анализа, и с применением кинетического моделирования осуществлен прогноз изменения содержания ИБП в процессе биодеструкции, определены период его полураспада, время окончания (10 сут.) и воспроизводимость процесса [Vihareva et al., 2023].

Цель работы – интенсификация процесса биодеструкции ИБП и сокращение его продолжительности на основе многофакторного эксперимента с использованием управляемых параметров ключевых факторов (концентрация глюкозы, n-гексадекана, бактериальных клеток, значение pH среды), а также кинетическое моделирование оптимизированного процесса.

Материалы и методы

В работе использовали натриевую соль ИБП ($C_{13}H_{17}NaO_2$, CAS 31121-93-4, α -метил-4-(изобутил)фенилуксусной кислоты; Sigma-Aldrich, США): белый кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде. Химические реагенты имели квалификацию х.ч., ч.д.а. или о.с.ч. (База № 1 химреактивов, Россия; Криохром, Россия; Merck, Германия; Sigma-Aldrich, США).

В качестве биодеструктора ИБП использовали штамм *R. cerastii* ИЭГМ 1243 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, <http://www.iegmc.ru>, ЦКП 480868, УНУ 73559, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур) [Catalogue of Strains..., 2023]. В колбу Эрленмейера вместимостью 250 см³ вносили 0.01 г ИБП, 100 см³ минерально-солевой среды (г/л): K_2HPO_4 – 1.0; KH_2PO_4 – 1.0; NH_4NO_3 – 1.0; NaCl – 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0.02; $FeCl_3 \cdot 7H_2O$ – 0.001, а также глюкозу (от 0.1 до 2.5 г/л) и *n*-гексадекан (от 0.1 до 50.0 мл/л) в качестве косубстратов (дополнительных источников углерода и энергии для бактериальных клеток). Инокулят (клетки родококков) вносили в соответствии со стандартным образцом мутности бактериальных взвесей БАК-5 (5 международных единиц мутности), при этом использовали от 10 до 200% концентрации клеток, необходимых для достижения БАК-5. Значение pH в интервале от 4.0 до 8.0 регулировали с помощью растворов HCl и NaOH, в интервале от 5.5 до 7.0 – с помощью изменения соотношения KH_2PO_4 и K_2HPO_4 в составе минеральной среды. Родококки предварительно выращивали в течение трех сут. в питательном бульоне LB (Sigma, США) и затем отмывали 10 мМ фосфатным буферным раствором (pH 7.0). Процесс биодеструкции ИБП проводили в течение 5 сут. в условиях периодического культивирования на орбитальном шейкере Certomat IS (Sartorius, Германия) при стабилизированных параметрах угловой скорости вращения шейкера (160 об/мин) и температуре 28°C. Отбор проб в количестве 1 мл проводили с интервалом 1 сут., в заключительных экспериментах – с интервалом 6 ч. Каждый опыт при варьировании параметров исследуемых факторов проводили в 3-кратных повторностях (реализациях) в одинаковых условиях.

Приборы и оборудование. Орбитальный шейкер Certomat IS (Sartorius, Германия); хроматограф; лабораторная центрифуга (12 000 об/мин, Eppendorf, Германия), pH-метр Hanna HI2215-02 (Hanna Instruments, США). Для обеспечения оптимального качества свежеприготовленной сверхчистой воды для ВЭЖХ использовали систему очистки воды Millipore Simplicity Personal Ultrapure Water System (Millipore, США).

Убыль ИБП в процессе биодеструкции регистрировали с помощью хроматографа LC Prominence 20A (Shimadzu, Япония), оснащенного обращено-фазной колонкой Kromasil 7uC18(2) 100A (4.6 mm × 250 mm) и диодно-матричным детектором (SPD-M20A). Условия хроматографического анализа ИБП: подвижная фаза ацетонитрил – фосфатный буферный раствор (pH 3) в соотношении 60:40; скорость потока элюента – 1 мл/мин; температура колонки – 40°C; объем пробы – 10 мкл; длина волны детектирования – 220 нм. В описанных условиях время удерживания ИБП составляло 10.80 ± 0.02 мин [Vikhareva et al., 2023]. Для осуществления ВЭЖХ-анализа аликвотную часть культуральной среды (1.0 мл), содержащую ИБП и его метаболиты, бактериальные клетки и продукты их жизнедеятельности, помещали в пробирку Эппендорфа и центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр с размером пор 0.45 мкм (Agilent Technologies, США). В качестве контролей использовали стерильную минеральную среду с ИБП (0.01%) без внесения бактериальных клеток (абиотический контроль) и стерильную минеральную среду с бактериальными клетками без ИБП (биотический контроль). Обработку полученных хроматографических данных проводили с использованием программного обеспечения LCSolution (v1.25 rus).

Для кинетического моделирования использовали кинетическое уравнение минус первого порядка $dx/dt = -k x^1$ с начальным условием $x_0 = 100\%$ при $t = 0$. Значения параметра скорости биодеструкции k в реализациях определяли с применением метода наименьших квадратов по полученным экспериментальным данным.

Результаты и обсуждение

Базовыми значениями варьируемых факторов были следующие: концентрация глюкозы 0.1 г/л, концентрация *n*-гексадекана 0.1 мл/л, концентрация клеток до соответствия стандарту мутности БАК-5, значение pH 7.0.

По нашим данным, варьирование концентраций глюкозы и *n*-гексадекана уменьшало продолжительность процесса до 3 сут. при использовании данных косубстратов в количестве 1.0 г/л и 10.0 мл/л соответственно (табл. 1, 2). В диапазоне концентраций глюкозы с 0.1 до 1.0 г/л и *n*-гексадекана с 0.1 до 10.0 мл/л наблюдалось существенное сокращение времени процесса. Увеличение концентрации глюкозы (более 1.0 г/л) и *n*-гексадекана (более 10.0 мл/л) не способствовало ускорению процесса биодеструкции ИБП.

Таблица 1

Динамика изменения содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при разных концентрациях глюкозы

[Ibuprofen concentration dynamics during biodegradation at different glucose levels]

Концентрация глюкозы, г/л	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
0.1	100	94.1	76.8	75.8	73.9	67.0
	100	88.6	70.8	59.0	55.1	53.9
	100	89.4	74.3	66.3	60.6	58.7
0.5	100	84.5	37.8	27.9	0.0	-
	100	76.0	27.8	24.4	17.7	0.0
	100	75.5	28.4	26.9	11.3	0.0
1.0	100	87.3	9.3	0.0	-	-
	100	86.5	8.5	0.0	-	-
	100	85.7	7.1	0.0	-	-
2.5	100	84.3	4.1	2.1	0.0	-
	100	86.5	2.9	3.1	0.0	-
	100	83.6	3.4	1.2	0.0	-

*Начальная концентрация ИБП принята за 100%.

Таблица 2

Динамика изменения содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при разных концентрациях *n*-гексадекана

[Ibuprofen concentration dynamics during biodegradation at different *n*-hexadecane levels]

Концентрация <i>n</i> -гексадекана, мл/л	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
0.1	100	94.1	76.8	75.8	73.9	67.0
	100	88.6	70.8	59.0	55.1	53.9
	100	88.4	72.5	61.3	57.6	54.2
1.0	100	87.2	18.0	0.0	-	-
	100	88.4	32.2	8.6	0.0	-
	100	87.1	28.5	6.6	0.0	-
10.0	100	87.3	9.3	0.0	-	-
	100	86.5	8.5	0.0	-	-
	100	85.7	7.1	0.0	-	-
50.0	100	86.3	2.5	0.0	-	-
	100	81.2	2.1	0.0	-	-
	100	83.3	3.6	0.0	-	-

*Начальная концентрация ИБП принята за 100%.

При варьировании рабочего объема бактериального инокулята принимали во внимание тот факт, что недостаточное его количество приводило к неспособности клеток преодолеть ингибирующее действие ИБП и к отсутствию их роста, и, как следствие, к значительному увеличению продолжительности лаг-фазы. Как видно из данных табл. 3, со снижением концентрации клеток ниже 50% от концентрации по БАК-5 снижается эффективность биодеструкции ИБП. Увеличение объема инокулята выше необходимой для БАК-5 не влияет на продолжительность процесса. Следовательно, рациональным значением данного фактора можно считать концентрацию инокулята, равную стандарту мутности БАК-5.

Таблица 3

Динамика изменения содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при разных концентрациях инокулята

[Ibuprofen concentration dynamics during biodegradation with varying inoculum concentrations]

Концентрация инокулята, %	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
10	100	99.9	99.3	97.9	81.4	63.3
	100	99.7	99.8	98.2	90.1	89.3
	100	99.7	97.2	97.1	85.5	80.2

Концентрация инокулята, %	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
50	100	96.3	73.3	71.4	57.6	55.5
	100	96.3	84.0	75.3	72.6	58.6
	100	96.2	80.2	72.5	60.6	57.5
100	100	94.1	76.8	75.8	73.9	67.0
	100	88.6	70.8	59.0	55.1	53.9
	100	89.7	73.5	62.6	60.2	58.9
200	100	90.9	77.7	75.5	73.9	73.0
	100	91.4	67.3	64.4	63.3	62.8
	100	91.4	69.6	67.5	65.6	61.8

*Начальная концентрация ИБП принята за 100%.

Наиболее значимым из исследованных факторов оказалось значение pH. При изменении показателя pH в щелочную сторону (с 6.0 до 8.0) продолжительность процесса увеличивалась (табл. 4). В кислой среде биодеструкция ИПБ практически не происходила.

Таблица 4

Динамика изменения содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при значениях pH 4.0–8.0
[Ibuprofen concentration dynamics throughout biodegradation across pH values 4.0–8.0]

Значение pH	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
4.0	100	100.0	100.0	99.0	99.0	97.0
	100	99.0	98.0	98.0	98.0	98.0
	100	100.0	100.0	99.0	98.0	98.0
5.0	100	97.0	92.0	89.0	87.0	86.8
	100	99.0	89.0	83.0	79.0	77.0
	100	99.0	97.0	91.0	86.0	79.0
6.0	100	93.3	61.6	30.3	22.9	18.8
	100	93.9	69.9	50.5	36.4	33.4
	100	93.6	62.5	37.6	29.8	23.5
7.0	100	98.4	92.8	90.9	88.6	87.5
	100	98.5	94.9	94.6	87.1	85.9
	100	98.5	93.0	91.3	87.0	86.0
8.0	100	99.2	99.1	98.3	95.4	92.4
	100	99.8	98.0	97.5	97.4	96.3
	100	99.2	99.0	98.0	97.1	94.8

*Начальная концентрация ИБП принята за 100%.

Следует отметить, что в процессе биодеструкции ИПБ происходило уменьшение значения pH культуральной среды, что приводило к увеличению времени процесса. В связи с этим возникла необходимость стабилизации pH. При повторении эксперимента со стабилизацией значений pH в пределах от 5.5 до 7.0 оказалось, что оптимальное значение pH равно 6.5. Время завершения процесса при этом уменьшилось до 2 сут. (табл. 5).

Таблица 5

Динамика изменения содержания ибупрофена в процессе биодеструкции при значениях pH 5.5–7.0
[Ibuprofen concentration dynamics throughout biodegradation across pH values 5.5–7.0]

Значение pH	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
5.5	100	78.77	18.04	0	-	-
	100	71.22	29.78	0	-	-
	100	76.33	37.56	1.21	0	-
6.0	100	67.32	0	-	-	-
	100	66.32	4.91	0	-	-
	100	66.08	0.85	0	-	-

Значение pH	Экспозиция, сут.					
	0	1	2	3	4	5
	Определено ИБП*, %					
6.5	100	56.87	0	-	-	-
	100	55.78	0	-	-	-
	100	58.02	0	-	-	-
7.0	100	70.62	28.12	0	-	-
	100	68.36	32.99	3.72	-	-
	100	75.76	32.16	1.75	-	-

*Начальная концентрация ИБП принята за 100%.

При разных значениях pH визуально рост культуры значительно различался (рис. 1). При pH 5.0 на вторые сутки процесса биодеструкции ИБП биомасса была белой, оформленной в длинные рыхлые агрегаты, мутность среды высокая. При pH 6.0 наблюдались агрегаты клеток кремового цвета. Наравне с мягкими белыми тяжами начали формироваться круглые, более плотные агрегаты яркой окраски, культуральная среда при этом имела меньшую мутность. При pH 6.5 на вторые сутки вся культура была организована в яркие агрегаты оранжевого цвета. При отстаивании биомасса всплывала, подосажденная жидкость была прозрачна (рис. 1).



Рис. 1. Внешний вид биомассы *R. cerastii* ИЭГМ 1243 при pH культуральной среды 5.0 (а), 6.0 (б), 6.5 (в)
[Visualization of *R. cerastii* IEGM 1243 in culture media at pH 5.0 (a), 6.0 (б), and 6.5 (в)]

Таким образом, в результате факторного анализа определили рациональные значения концентрации глюкозы (1.0 г/л), *n*-гексадекана (10.0 мл/л), инокулята (БАК-5) и pH среды (6.5). Продолжительность процесса биодеструкции ИБП при этих значениях параметров находится в интервале 24–48 ч.

Для уточнения времени завершения процесса он был воспроизведен в 9-ти реализациях в одинаковых рациональных условиях со стабилизацией pH среды на уровне 6.5 (табл. 6). На данном этапе работы было использовано кинетическое моделирование.

Таблица 6

Динамика процесса биодеструкции ибупрофена (0.01 %) клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243
[Dynamics of ibuprofen (0.01%) biodegradation by *R. cerastii* IEGM 1243]

№ п/п	Экспозиция, час.					Кинетическое моделирование		
	0	18	24	30	36	k , % ² /ч	$t_{1/2}$, ч	$t_{1/100}$, ч
	Концентрация ибупрофена, %							
1	100	69.54	51.97	28.69	0	146.84	25.54	34.05
2	100	71.62	54.40	30.69	0	142.96	26.23	34.97
3	100	72.50	54.42	31.30	0	141.91	26.43	35.23
4	100	71.57	53.20	27.88	0	144.37	25.98	34.63
5	100	70.00	51.92	28.67	0	146.42	25.61	34.14
6	100	72.72	54.32	31.88	0	141.59	26.48	35.31
7	100	72.51	57.47	35.74	0	138.88	27.00	36.00
8	100	71.72	58.54	34.49	0	139.39	26.90	35.87
9	100	72.71	56.96	33.75	0	139.56	26.87	35.82

*Начальная концентрация ИБП принята за 100%.

Поскольку в условиях стабилизации pH среды на уровне 6.5 скорость уменьшения концентрации ИБП оказалась обратно пропорциональной концентрации ИБП в процессе биодеструкции (табл. 6), для моделирования использовали кинетическое уравнение минус первого порядка $dx/dt = -k x^{-1}$ с начальным

условием $x_0 = 100\%$ при $t = 0$. После интегрирования уравнение кинетической кривой приняло вид $x = (x_0^2 - 2kt)^{1/2}$. Значения параметра скорости биодеструкции k в реализациях определяли с применением метода наименьших квадратов по полученным экспериментальным данным (табл. 6). Помимо этого, согласно выражению $t_{1/2} = 0.75 x_0^2 / (2k)$ определяли период полураспада ИБП в процессе биодеструкции, а по выражению $t_{1/100} = 0.9999 x_0^2 / (2k)$ устанавливали время окончания процесса при 100-кратном уменьшении начальной концентрации исследуемого вещества (табл. 6).

Кинетические кривые, характеризующие изменение остаточной концентрации ИБП в среде культивирования родококков (рис. 2), хорошо соответствуют полученным экспериментальным данным (табл. 6).

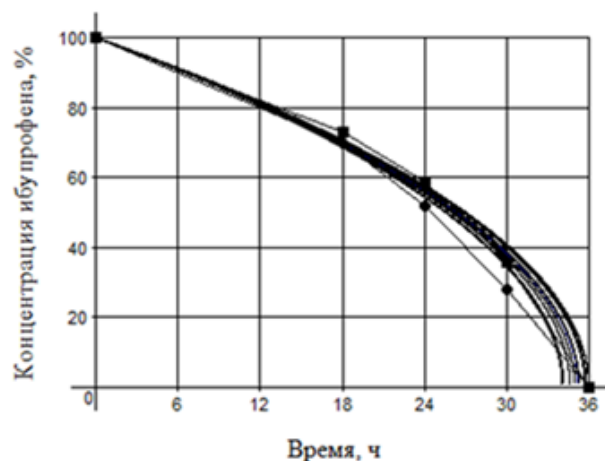


Рис. 2. Кинетические кривые изменения концентрации ибупрофена в процессе биодеструкции клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в условиях стабилизации рН среды (точками показаны экспериментальные значения пределов концентрации)

[Kinetic curves of ibuprofen concentration changes during biodegradation by *R. cerastii* IEGM 1243 cells with pH stabilization (experimental concentration limits marked as dots)]

Значения параметра k скорости процесса биодеструкции ИБП находятся в пределах $138.88 \div 146.84\% / \text{ч}$, период полураспада $t_{1/2} - 25.54 \div 27.00$ ч, время окончания процесса $t_{1/100} - 34.05 \div 36.00$ ч. Доверительные интервалы для выборочных средних значений параметра скорости, периода полураспада и времени окончания процесса, установленные с применением критического значения коэффициента Стьюдента для доверительной вероятности $P = 95\%$ и числа степеней свободы $(n - 1) = 8$, составляют $(142.44 \pm 2.28) \% / \text{ч}$, (26.34 ± 0.42) ч и (35.11 ± 0.56) ч соответственно. Полученное значение относительного стандартного отклонения для данных интервалов (2.08%) свидетельствует о приемлемой воспроизводимости интенсифицированного варианта процесса биодеструкции ИБП [Сергиенко, Бондарева, 2000].

Заключение

Проведенный факторный анализ позволил выделить три варьируемых фактора, оказывающих наибольшее влияние на процесс биодеструкции ибупрофена актинобактериями рода *Rhodococcus*: концентрация глюкозы, концентрация *n*-гексадекана и параметр кислотности среды рН. Методом прямого экспериментального поиска определены их значения, позволившие сократить продолжительность процесса биодеструкции с 10 до 2 сут.

Кинетическое моделирование результатов эксперимента на повторяемость позволило с вероятностью $P = 95\%$ получить доверительный интервал для времени завершения процесса, равный (35.11 ± 0.56) ч., а также уточнить время завершения процесса (1.5 сут.). Ключевым фактором оказалось значение кислотности среды. Стабилизация рН культуральной среды родококков кардинально изменила ход процесса: при уменьшении концентрации ибупрофена скорость биодеструкции увеличивалась, в связи с чем в кинетических уравнениях вместо 1-го использовали минус 1-ый порядок, хорошо описывающий экспериментальные данные.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке биотехнологических способов очистки сточных вод фармацевтических предприятий от опасных для окружающей природной среды фармацевтических отходов.

Список источников

1. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. М: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. 256 с.

2. Anteneh Y.S., Franco C.M.M. Whole cell actinobacteria as biocatalysts // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 77. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00077.
3. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. URL: <http://www.iegmc.ru/strains/index.html>. (Дата обращения: 01.11.2023).
4. Chopra S., Kumar D. Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation // *Heliyon*. 2020. Vol. 6, № 6. P. e04087. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04087.
5. Girardot F. et al. Bacterial diversity on an abandoned, industrial wasteland contaminated by polychlorinated biphenyls, dioxins, furans and trace metals // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 748. P. 141242. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141242.
6. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation // *Microbial Resources. From Functional Existence in Nature to Applications* / ed. I.B. Kurtböke. Academic Press, 2017. P. 121–148. DOI: 10.1016/B978-0-12-804765-1.00006-0
7. Ivshina I.B. et al. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* // *Current Microbiology*. 2015. Vol. 70, № 3. P. 307–314. DOI:10.1007/s00284-014-0718-1.
8. Ivshina I.B. et al. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9. P. 9159. DOI: 10.1038/s41598-019-45732-9.
9. Ivshina I.B. et al. Response of *Rhodococcus cerastii* IEGM 1278 to toxic effect of ibuprofen // *PLoS ONE*. 2021. Vol. 16, № 11. P. e0260032. DOI: 10.1371/journal.pone.0260032.
10. Karpenko Yu.N. et al. Chromatographic determination of drotaverine hydrochloride and kinetic modeling of the process of its biodestruction in a *R. rhodochrous* culture liquid // *Journal of Analytical Chemistry*. 2014. Vol. 69, № 7. P. 681–685. DOI: 10.1134/S1061934814070077.
11. Khrenkov A.N. et al. Chromatographic analysis of acetylsalicylic acid in *Rhodococcus* cultural fluids // *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2020. Vol. 61, № 5. P. 309–314. DOI: 10.3103/S0027131420050053
12. Patel M. et al. Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods // *Chemical Reviews*. 2019. Vol. 119, № 6. P. 3510–3673. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00299.
13. Plotnikov A.N. et al. Determination of codeine phosphate in the culture fluid of *Rhodococcus* by high-performance liquid chromatography // *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2017. Vol. 72, № 6. P.328–332. DOI: 10.3103/S0027131418010054.
14. Sánchez-Aceves L. et al. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of ibuprofen and aluminum alters oxidative stress status on *Danio rerio* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*. 2021. Vol. 248. P. 109071. DOI: 10.1016/j.cbpc.2021.109071.
15. Vikhareva E.V. et al. Chromatographic determination of ibuprofen in *Rhodococcus* culture media and kinetic modeling of its biodegradation process // *Journal of Analytical Chemistry*. 2023. Vol. 78, № 2. P. 241–246. DOI: 10.1134/S1061934823010136.

References

1. Sergiyenko V.I., Bondareva I.B. *Matematicheskaja statistika v kliničeskich issledovanijach* [Mathematical statistics in clinical research]. Moscow, GEOTAR Medicina Publ., 2000. 256 p. (In Russ.).
2. Anteneh Y.S., Franco C.M.M. Whole cell actinobacteria as biocatalysts. *Frontiers in Microbiology*. V. 10 (2019): pp. 77. DOI: 0:77. 10.3389/fmicb.2019.00077.
3. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. URL: <http://www.iegmc.ru/strains/index.html>. (accessed: 01.11.2023).
4. Chopra S., Kumar D. Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation. *Heliyon*. V. 6, No. 6 (2020): pp. e04087. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04087.
5. Girardot F., Allégra S., Pfendler S., Conord C., Rey C., Gillet B., Hughes S., Bouchardon A.E., Hua A., Paran F., Bouchardon J.L., Faure O. Bacterial diversity on an abandoned, industrial wasteland contaminated by polychlorinated biphenyls, dioxins, furans and trace metals. *Science of the Total Environment*. V. 748 (2020): pp. 141242. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141242.
6. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation In: *Microbial Resources. From Functional Existence in Nature to Applications* / ed. I.B. Kurtböke. Academic Press, 2017. P. 121-148. DOI: 10.1016/B978-0-12-804765-1.00006-0.
7. Ivshina I.B., Mukhutdinova A.N., Tyumina H.A., Vikhareva H.V., Suzina N.E., El'-Registan G.I., Mulyukin A.L. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber*. *Current Microbiology*. V. 70, No. 3 (2015): pp. 307-314. DOI: 10.1007/s00284-014-0718-1.
8. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Kuzmina M.V., Vikhareva E.V. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346. *Scientific Reports*. V. 9 (2019): pp. 9159. DOI: 10.1038/s41598-019-45732-9.
9. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Bazhutina G.A., Vikhareva E.V. Response of *Rhodococcus cerastii* IEGM 1278 to toxic effect of ibuprofen. *PLoS ONE*. V. 16, No. 11 (2021): pp. e0260032. DOI: 10.1371/journal.pone.0260032.

10. Karpenko Yu.N., Selyaninov A.A., Mukhutdinova A.N., Rychkova M.I., Baranova A.A., Vikhareva E.V., Ivshina I.B. Chromatographic determination of drotaverine hydrochloride and kinetic modeling of the process of its biodestruction in a *R. rhodochrous* culture liquid. *Journal of Analytical Chemistry*. V. 69, No. 7 (2014): pp. 681-685. DOI: 10.1134/S1061934814070077.

11. Khrenkov A.N., Vikhareva E.V., Tumulovich E.Yu., Karpenko Yu.N., Selyaninov A.A., Tyumina E.A. Chromatographic analysis of acetylsalicylic acid in *Rhodococcus* cultural fluids. *Moscow University Chemistry Bulletin*. V. 61, No. 5 (2020): pp. 309-314. DOI: 10.3103/S0027131420050053.

12. Patel M., Kumar R., Kishor K., Mlsna T., Pittman C.U. Jr., Mohan D. Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chemical Reviews*. V. 119, No. 6 (2019): pp. 3510-3673. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00299.

13. Plotnikov A.N., Karpenko Y.N., Vikhareva E.V., Tyumina E.A., Richkova M.I., Selyaninov A.A. Determination of codeine phosphate in the culture fluid of *Rhodococcus* by high-performance liquid chromatography. *Moscow University Chemistry Bulletin*. V. 72, No. 6 (2017): pp. 328-332. DOI: 10.3103/S0027131418010054.

14. Sánchez-Aceves L., Pérez-Alvarez I., Gómez-Oliván L.M., Islas-Flores H., Barceló D. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of ibuprofen and aluminum alters oxidative stress status on *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*. V. 248 (2021): pp. 109071. DOI: 10.1016/j.cbpc.2021.109071.

15. Vikhareva E.V., Selyaninov A.A., Bazhutin G.A., Tyumina E.A. Chromatographic determination of ibuprofen in *Rhodococcus* culture media and kinetic modeling of its biodegradation process. *Journal of Analytical Chemistry*. V. 78, No. 2 (2023): pp. 241-246. DOI: 10.1134/S1061934823010136.

Статья поступила в редакцию 01.11.2023; одобрена после рецензирования 08.11.2023; принята к публикации 20.11.2023.

The article was submitted 01.11.2023; approved after reviewing 08.11.2023; accepted for publication 20.11.2023.

Информация об авторах

Г. А. Бажутин – инженер лаборатории алканотрофных микроорганизмов, инженер Rhodococcus-центра;
Е. А. Тюмина – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории алканотрофных организмов, старший преподаватель кафедры микробиологии и иммунологии;
А. А. Селянинов – доктор технических наук, профессор кафедры теоретической механики с курсом биомеханики;
Е. В. Вихарева – доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой аналитической химии.

Information about the authors

G. A. Bazhutin – engineer of the Laboratory of alkanotrophic microorganisms, engineer of the Rhodococcus-center;
E. A. Tyumina – candidate of biological sciences, researcher at the Laboratory of alkanotrophic organisms, senior lecturer at the Department of Microbiology and Immunology;
A. A. Selyaninov – doctor of technical sciences, professor of the Department of theoretical mechanics with a course in biomechanics;
E. V. Vikhareva – doctor of pharmaceutical sciences, professor, head of the Department of analytical chemistry.

Вклад авторов:

Бажутин Г. А. – проведение экспериментов; обработка результатов; написание исходного текста.
Тюмина Е. А. – доработка текста.
Селянинов А. А. – статистическая обработка материала; написание исходного текста.
Вихарева Е. В. – концепция исследования; методология; написание исходного текста.

Contribution of the authors:

Bazhutin G. A. – performing the experiments; formal data analysis; writing the initial draft.
Tyumina E. A. – editing the manuscript.
Selyaninov A. A. – data analysis; writing the initial draft.
Vikhareva E. V. – formulation of research goals; development of methodology; writing the initial draft.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579:873:579.222.2

doi: 10.17072/1994-9952-2023-4-337-348

Устойчивость коллекционных штаммов родококков к воздействию экотоксиканта – этоксилированного нонилфенола

Елена Александровна Баяндина^{1✉}, Анастасия Владимировна Поздеева²,
Мария Станиславовна Куюкина^{3, 5}, Ирина Борисовна Ившина^{4, 6}

¹⁻⁴ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

^{5, 6} Институт экологии и генетики микроорганизмов ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

^{1✉} elenabaiandinapsu@gmail.com

² pozdeeva07@gmail.com

^{3, 5} kuyukina@iegm.ru

^{4, 6} ivshina@iegm.ru

Аннотация. Этоксиллированный нонилфенол (ЭНФ) – широко применяемый поверхностно-активный агент, относящийся к наиболее распространенным ксеноэстрогенам – гормоноподобным ксенобиотикам, накопление которых в окружающей среде оказывает негативное воздействие на эндокринную систему животных и человека, повышая тем самым уровень экологического риска. Естественные процессы биодegradации ЭНФ затруднены вследствие его высокой токсичности для водных и почвенных микроорганизмов, что требует поиска устойчивых штаммов-биодеструкторов данного экотоксиканта. В работе выполнен скрининг 50 штаммов актинобактерий рода *Rhodococcus* из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, <http://www.iegmcol.ru>) по устойчивости к ЭНФ и изучено воздействие ксенобиотика на динамику формирования биопленок родококков. Отобраны устойчивые к высоким (МИК > 125 г/л) концентрациям ЭНФ штаммы *R. ruber* ИЭГМ 615, ИЭГМ 1263, *R. rhodochrous* ИЭГМ 655, выделенные из нефтезагрязненных экосистем. Показано, что длительное (до 72 ч.) культивирование биопленок *R. ruber* ИЭГМ 71 в присутствии 15 г/л ЭНФ способствовало увеличению адгезивной активности клеток и синтезу экзополимерного матрикса, играющего основную роль в защите бактерий от токсичного воздействия ЭНФ. Полученные данные раскрывают потенциал родококков для детоксикации ксеноэстрогенов из группы алкилированных фенолов, что может быть использовано при разработке биотехнологических методов очистки окружающей среды от данных экотоксикантов.

Ключевые слова: биоремедиация, *Rhodococcus*, этоксилированный нонилфенол, устойчивость, минимальная ингибирующая концентрация, биопленки, КЛСМ

Для цитирования: Устойчивость коллекционных штаммов родококков к воздействию экотоксиканта – этоксилированного нонилфенола / Е. А. Баяндина, А. П. Поздеева, М. С. Куюкина, И. Б. Ившина // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 4. С. 337–348. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-337-348>.

Благодарности: работа выполнена в рамках госзаданий 123041400034-2, 122010800029-1 и поддержана грантом МИГ С-26/827. Использовано оборудование ЦКП «Специализированный кабинет атомно-силовой и конфокальной микроскопии» ПГНИУ и ЦКП «Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов» ПФИЦ УрО РАН.

MICROBIOLOGY

Original article

Resistance of *Rhodococcus* collection strains to the effects of ecotoxicant – ethoxylated nonylphenol

Elena A. Bayandina^{1✉}, Anastasia V. Pozdeeva², Maria S. Kuyukina^{3, 5},
Irena B. Ivshina^{4, 6}

¹⁻⁴ Perm State University, Perm, Russia

^{5, 6} Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms PFRC of the Ural Branch RAS, Perm, Russia

^{1✉} elenabaiandinapsu@gmail.com

² pozdeeva07@gmail.com

^{3, 5} kuyukina@iegm.ru

Abstract. Ethoxylated nonylphenol (ENP), a widely used surfactant, is one of the most common xenoestrogens, hormone-like xenobiotics, the accumulation of which in the environment has a negative impact on the endocrine system of animals and humans, thereby increasing the level of environmental risk. Natural processes of ENP biodegradation are hindered due to its high toxicity to soil and aquatic microorganisms, which requires the selection of resistant strains-biodegraders of this ecopollutant. The screening of 50 strains of actinobacteria of the genus *Rhodococcus* from the Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms (acronym IEGM, <http://www.iegmcol.ru>) on resistance to ENP and the effect of xenobiotics on the dynamics of the formation of rhodococcal biofilms was studied. The strains *R. ruber* IEGM 615, 1263, and *R. rhodochrous* IEGM 655, isolated from oil-polluted ecosystems, resistant to high (MIC > 125 g/l) concentrations of ENP, were selected. It has been shown that long-term (up to 72 h) cultivation of *R. ruber* IEGM 71 biofilms in the presence of 15 g/l ENP contributed to an increase in the adhesive activity of cells and the synthesis of an exopolymer matrix, which plays a major role in protecting bacteria from the toxic effects of ENP. The obtained data reveal the potential of rhodococci for detoxification of xenoestrogens from the group of alkylated phenols, what can be used in the development of biotechnological methods of environmental purification from these ecotoxins.

Keywords: bioremediation, *Rhodococcus*, ethoxylated nonylphenol, resistance, minimum inhibitory concentration, biofilms, CLSM

For citation: Bayandina E. A., Pozdeeva A. V., Kuyukina M. S., Ivshina I. B. [Resistance of collection strains of *Rhodococcus* to the effects of ecotoxin – ethoxylated nonylphenol]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2023): pp. 337-348. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-337-348>.

Acknowledgments: the work was carried out within the framework of state tasks 123041400034-2, 122010800029-1 and supported by the MIG C-26/827 grant. The research work was carried out using the equipment of the Core Facilities Centers "Specialized cabinet of atomic force and confocal microscopy" (PSU) and "Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms" (IEGM PFRC UB RAS).

Введение

Этоксилаты нонилфенола широко используются в различных отраслях промышленности в качестве поверхностно-активных веществ, эмульгаторов, смачивающих и диспергирующих веществ, а также солюбилизаторов [Quina, Hinze, 1999; Materna et al., 2001; Dong, Hao, 2010; Negin, Ali, Xie, 2017; Priac et al., 2017]. Попадая в окружающую среду со сточными водами, этоксилированный нонилфенол (ЭНФ) и продукты его разложения оказывают негативное воздействие на представителей флоры и фауны, что связано с их способностью выступать как эстрогены и нарушать гормональный баланс у живых организмов [Ferguson et al., 2003]. Эти соединения могут накапливаться в тканях организмов и вызывать изменения в репродуктивной системе, гормональные нарушения, воздействуя на иммунную, нервную системы, проявляя токсичность для экосистемы в целом. Поэтому контроль, ограничение использования и распространения ЭНФ являются важными мерами для защиты окружающей среды и сохранения биологического разнообразия [Kovalchuk et al., 2007; Fucic et al., 2012; Shen et al., 2016; Ademollo et al., 2018; Petrick et al., 2020; Seralini, Jungers, 2021]. В почве и воде ЭНФ подвергается частичной деградации и превращается в нонилфенол, который может длительно существовать в различных изомерных формах [White, 1993; Eganhouse et al., 2009; Lu, Gan, 2014; Korsman et al., 2015; Peng et al., 2023].

Процессы биodeградации ЭНФ и нонилфенола описаны для некоторых родов бактерий, в частности *Acidovorax*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* и *Stenotropomonas* [Soares et al., 2003; Corvini et al., 2004; Yuan, Yu, Chang, 2004; Watanabe et al., 2012; Ruiz et al., 2013], а также грибов *Rhodotorula* [Wu, Qiu, 2011] и *Metarhizium* [Różalska et al., 2015]. Некоторые исследователи изучали деградацию алкилфенолов природными сообществами загрязненных почв [Kim, Kwak, An, 2019], речных отложений [Cladière et al., 2014], смешанными микробными популяциями в биореакторах [Buitrón, Torres-Vojorges, Sea-Barcia, 2015; Ferrer-Polonio et al., 2022] и очистных сооружениях [Lara-Moreno et al., 2022]. При этом показано [Кузикова и др., 2019], что естественные процессы биodeградации ЭНФ затруднены вследствие его высокой токсичности для водных и почвенных микроорганизмов.

Актинобактерии рода *Rhodococcus* характеризуются широким спектром деградируемых соединений, включая алифатические и ароматические углеводороды, галогенированные и азотсодержащие производные, а также органические растворители, пестициды, фармполлютанты, гормоны и средства личной гигиены [Ivshina et al., 2012; Krivoruchko, Kuyukina, Ivshina, 2019; Nazari et al., 2022; Tian et al., 2022]. Родоккокки способны к формированию биопленок, состоящих из бактериальных клеток и ассоциированного с ними экзополимерного матрикса (ЭПМ), образованного полисахаридами, белками и липидами и играющего важную роль в защите клеток от воздействия токсичных факторов [Bayandina et al., 2022]. Следует отметить, что формирование биопленок является преимущественным способом существования микроорганизмов в окружающей среде, который обеспечивает защиту клеток от физико-химических и биологических воздействий, тем самым позволяя им выживать в стрессовой среде [Flemming, Wuertz,

2019]. В литературе описан процесс разложения 17β -эстрадиола клетками *Rhodococcus equi* DSSKP-R-001 [Wang, 2019], однако биодеградация других ксеноэстрогенов родококками ранее не исследовалась.

Цель работы – изучение влияния ЭНФ на жизнеспособность актинобактерий рода *Rhodococcus* в планктонной культуре и в составе биопленок, а также отбор устойчивых коллекционных штаммов для возможного применения в технологиях очистки окружающей среды от токсичных ксеноэстрогенов.

Материалы и методы

Бактериальные культуры и условия культивирования. В работе использовали 50 штаммов родококков из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 285, <http://www.iegmc.org>). Культуры принадлежали к трем видам *Rhodococcus*: *R. erythropolis* (33 штамма), *R. rhodochrous* (4 штамма), *R. ruber* (13 штаммов). Выбор коллекционных штаммов определялся их высокой каталитической активностью по отношению к сложным органическим соединениям.

Культивирование биопленок на покровных стеклах ($24 \times 50 \times 0.15$ мм) для микроскопии (Gerhard Menzel, UK) осуществляли в жидкой минеральной среде К [Ившина, Каменских, Ляпунов, 1994], содержащей 1.0 об. % *n*-гексадекана, в колбах Эрленмейера объемом 150 мл при постоянном перемешивании (130 об/мин), 28°C в течение 24–72 ч. В экспериментах использовали ЭНФ марки «Verol 09» (Akso Nobel, Швеция) в концентрации 5, 10 и 15 г/л.

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) ЭНФ в отношении родококков проводили методом двукратных серийных разведений в среде RS [Куюкина и др., 2000] с использованием 96-луночных микропланшетов («Медполимер», Россия). ЭНФ вносили в лунки микропланшета в начальной концентрации 250 г/л с последующим двукратным разведением, после чего добавляли по 10 мкл бактериальной суспензии (3.0×10^7 кл/мл) и осуществляли инкубирование в течение 3 сут. при температуре 28°C. Затем бактериальные клетки окрашивали 0.2%-ным водным раствором йодонитротетразолия (ИНТ). Оценку жизнеспособности клеток проводили по изменению оптической плотности (ОП) суспензии вследствие образования красно-фиолетового формазана с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation, США) при длине волны 630 нм.

Методика КЛСМ-сканирования. Покровное стекло с выращенной биопленкой подсушивали на воздухе в течение 10–15 мин., затем добавляли флуоресцентный краситель LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США) и оставляли в темном месте на 15–20 мин. Препарат промывали деионизированной водой для удаления остатков красителя, среды и планктонных клеток. КЛСМ-сканирование проводили с помощью микроскопа FluoView 1000 (Olympus, Япония) с использованием иммерсионного объектива ($\times 100$, числовая апертура 1.4). Для возбуждения флуоресценции SYTO9 и пропидиум йодида, входящих в состав красителя LIVE/DEAD®, применяли аргоновый лазер ($\lambda = 488$ нм) с 505/525-нм барьерным фильтром, и гелий-неоновый лазер ($\lambda = 543$ нм) с 560/660-нм барьерным фильтром. Полученные изображения анализировали с помощью программы FV10-ASW 3.1 (Olympus Corporation, Япония).

Статистический анализ результатов исследований проводили с использованием стандартной программы Excel 2016, вычисляя среднее значение и стандартное отклонение ($m \pm SD$). Кластерный и корреляционный анализ данных (коэффициент Пирсона с уровнем значимости $p < 0.005$) проводили с помощью программы Past3.

Результаты и их обсуждение

Представленная дендрограмма (рис. 1) иллюстрирует распределение исследованных коллекционных штаммов родококков по кластерам в зависимости от значений МИК ЭНФ. По нашим данным, почти половина (24 из 50 исследованных культур) представителей *Rhodococcus* spp. не сохраняли жизнеспособность при концентрации ЭНФ свыше 0.5–2.0 г/л, что указывает на высокую токсичность данного соединения. Остальные штаммы группировались в 3 основные группы с соответствующими значениями МИК ЭНФ: 2–50, 50–125 и >125 г/л. Видоспецифические различия в чувствительности родококков к действию ЭНФ не выявлены. При этом штаммы *R. erythropolis* в целом характеризовались более высокой чувствительностью к воздействию ЭНФ по сравнению с представителями *R. ruber* и *R. rhodochrous* (соответствующие средневидовые значения МИК ЭНФ составили 22, 96 и 100 г/л). Возможно, более высокая устойчивость представителей *R. rhodochrous* и *R. ruber* связана с их способностью продуцировать недиффундирующий красно-оранжевый пигмент (тогда как колонии *R. erythropolis* имеют палево-телесную окраску), участвующий в защите клеток от повреждающих факторов, в частности ионов тяжелых металлов [Ившина, Куюкина, Костина, 2013]. Отобраны наиболее устойчивые к высоким (МИК ≥ 125 г/л) концен-

трациям ЭНФ штаммы *R. ruber* ИЭГМ 615, *R. ruber* ИЭГМ 1263 и *R. rhodochrous* ИЭГМ 655, являющиеся представителями экологически значимых видов родококков.

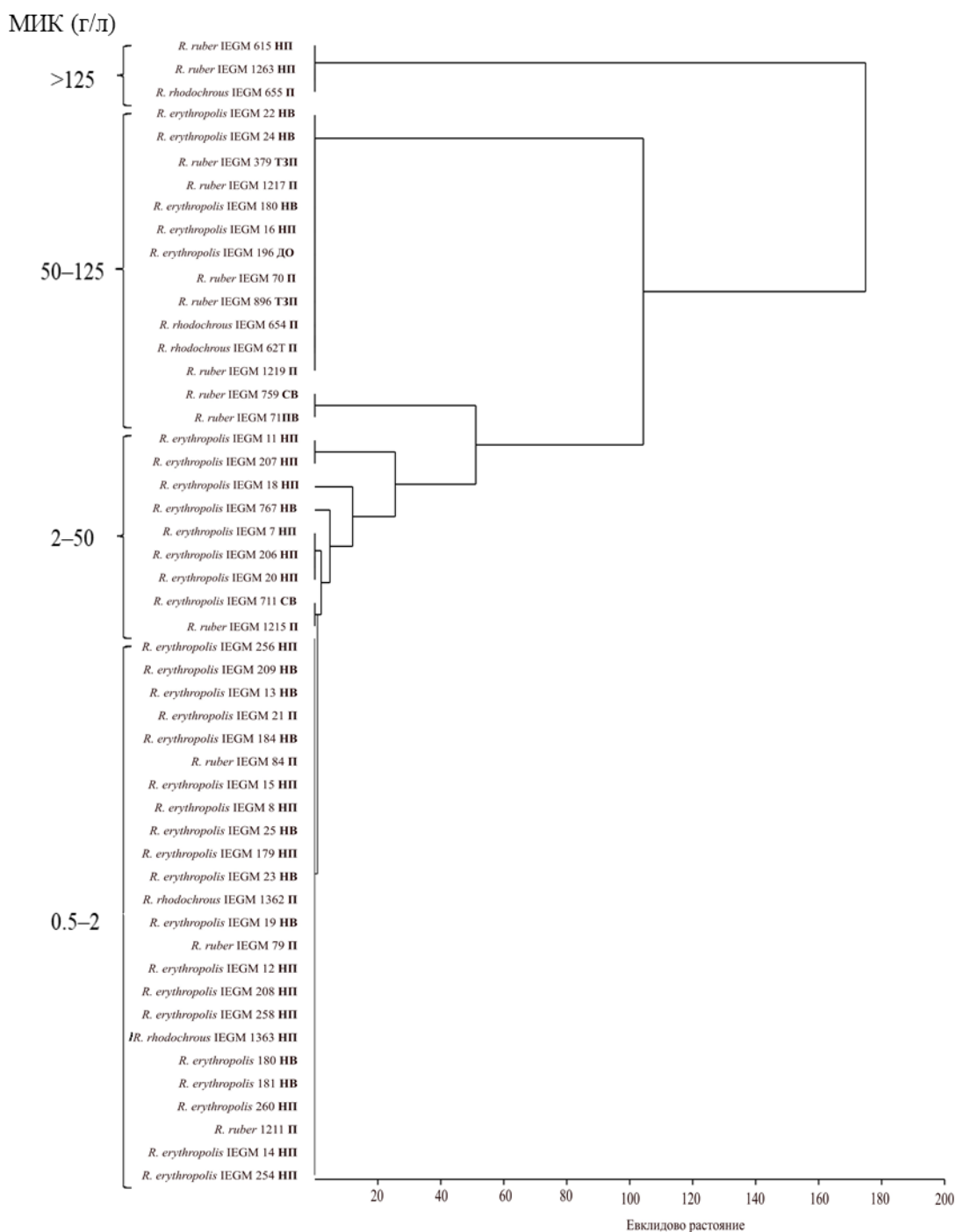


Рис. 1. Дендрограмма распределения коллекционных штаммов *Rhodococcus* spp. по чувствительности к ЭНФ.

МИК – минимальная ингибирующая концентрация. ДО – донные отложения, НП – нефтезагрязненная почва, НВ – нефтезагрязненная вода, П – почва, ТЗП – техногенно загрязненная почва, СВ – сточная вода

[Dendrogram of distribution of collection strains of *Rhodococcus* spp. according to sensitivity to ENP.

MIC – minimum inhibitory concentration. BS – bottom sediments, OCS – oil-contaminated soil, OCW – oil-contaminated water, S – soil, TCP – technogenically contaminated soil, SW – sewage wastewater]

Родококки представляют собой значительную часть почвенных бактериальных сообществ, обитающих в местах, загрязненных углеводородами и их производными [Ившина и др., 2021]. Результаты проведенного корреляционного анализа указывают на отсутствие строгой корреляции (коэффициент Пирсо-

на составил 0.14 при $p = 0.34$) между устойчивостью исследованных штаммов к ЭНФ и их приуроченностью к нефтезагрязненным местообитаниям. Тем не менее, в группе высокорезистентных (МИК ≥ 50 г/л) штаммов в основном присутствовали культуры, выделенные из техногенно загрязненных, в том числе нефтезагрязненных, почв (*R. erythropolis* ИЭГМ 16, *R. rhodochrous* ИЭГМ 62^T, ИЭГМ 655, *R. ruber* ИЭГМ 70, ИЭГМ 379, ИЭГМ 615, ИЭГМ 896, ИЭГМ 1263), нефтезагрязненных (*R. erythropolis* ИЭГМ 22, ИЭГМ 24, ИЭГМ 180, *R. ruber* ИЭГМ 615) и сточных (*R. ruber* ИЭГМ 759) вод. Полученные результаты согласуются с данными [Кузикова и др., 2019], отмечающими повышение доли актинобактерий, в частности представителей семейства *Micrococcaceae*, в почве при увеличении концентрации нонилфенолов в загрязненной почве. Аналогично при изучении биоразнообразия активного ила очистных сооружений [Villemur et al., 2013], из всех бактериальных изолятов только *Rhodococcus* sp. EMS-1 проявлял устойчивость и значительную способность к деградации ксеноэстрогенов.

В качестве примера на рис. 2 представлена динамика жизнеспособности клеток устойчивых и чувствительных штаммов родококков в присутствии возрастающих концентраций ЭНФ. Клетки *R. ruber* ИЭГМ 71 сохраняли 40–80% дыхательной активности при концентрации ЭНФ в диапазоне 125–250 г/л. Для сравнения, в клетках чувствительного штамма *R. erythropolis* ИЭГМ 711 процессы дыхания снижались на 70–80% при концентрации ЭНФ 0.5–1.0 г/л и практически полностью прекращались в присутствии >2.0 г/л ЭНФ.

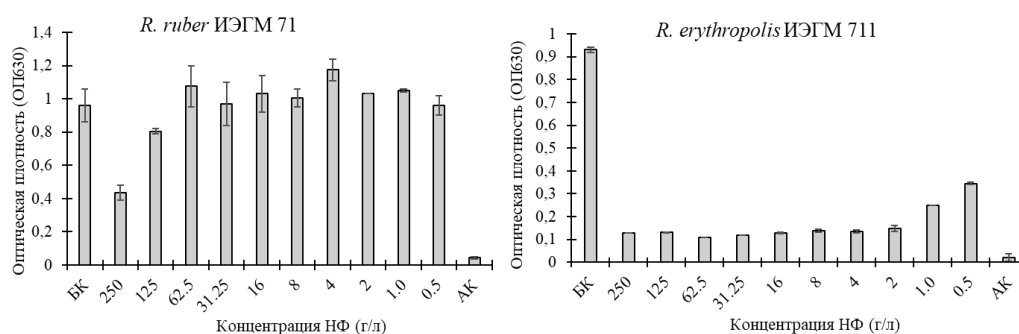


Рис. 2. Динамика жизнеспособности клеток *R. ruber* ИЭГМ 71 и *R. erythropolis* ИЭГМ 711 в присутствии возрастающих концентраций ЭНФ.

Представлены значения ОП₆₃₀ клеточных суспензий, окрашенных ИНТ. АК – абиотический контроль, БК – биотический контроль

[Dynamics of cell viability of *R. ruber* IEGM 71 and *R. erythropolis* IEGM 711 in the presence of increasing concentrations of ENP.

The OD₆₃₀ values of cell suspensions stained with INT are presented. АК – abiotic control, BC – biotic control]

Далее с помощью КЛСМ была изучена сравнительная динамика формирования биопленок клетками *R. ruber* ИЭГМ 71 при воздействии различных концентраций ЭНФ (рис. 3). Формирование биопленок – комплексный динамический процесс, включающий несколько этапов: адгезию клеток на поверхности и перераспределение клеточной массы, активное деление клеток для создания клеточных колоний или кластеров и в конечном итоге образование ЭПМ, который способствует защите клеток от неблагоприятных воздействий [Flemming, Wuertz, 2019]. Адгезивная активность бактерий во многом определяется свойствами клеточной поверхности, прежде всего степенью ее гидрофобности [Hoostal, Bidart-Bouzat, Bouzat, 2008], на которую значительное влияние оказывают условия культивирования. По данным [Wilmaerts et al., 2019; Ившина и др., 2021], клетки родококков лучше коадгезируют при росте на гидрофобных субстратах. В этой связи биопленки родококков выращивали в минеральной среде в присутствии 1.0 об. % *n*-гексадекана в ранее подобранных [Bayandina et al., 2022] динамических условиях, обеспечивающих равномерную адгезию клеток к покровному стеклу.

Как видно из рис. 3, морфология клеток *R. ruber* ИЭГМ 71 в биопленках изменялась незначительно при воздействии сравнительно высоких (5–15 г/л) концентраций ЭНФ. При этом уже при минимальной (5 г/л) концентрации ЭНФ наблюдался процесс коагрегации клеток, усиливающийся равномерно при повышении концентрации экотоксиканта. На КЛСМ-сканах биопленок, окрашенных дифференцирующим красителем LIVE/DEAD®, видно (рис. 3В), что при воздействии высоких (10–15 г/л) концентраций ЭНФ живые клетки родококков заключены в экзополимерный матрикс, образованный мертвыми клетками и компонентами ЭПМ. По мере созревания биопленок (24–72 ч.) интенсивность образования ЭПМ увеличивалась в прямой зависимости от воздействующей концентрации ЭНФ.

По нашим данным (рис. 4), жизнеспособность клеток *R. ruber* ИЭГМ 71 в составе биопленок поддерживалась на высоком (70–80%) уровне при воздействии 5–10 г/л ЭНФ и снижалась на 40–60% в присутствии повышенной (15 г/л) концентрации ЭНФ. Полученные результаты согласуются с данными других

исследователей, отмечающих выраженный ингибиторный эффект высоких концентраций ЭНФ в отношении как микробных биопленок, так и планктонных клеток [Writer, Joseph, Larry, 2011]. При этом жизнеспособность родококков в составе зрелых (48–72 ч.) биопленок была заметно выше и при концентрациях 5 и 10 г/л ЭНФ практически не отличалась от контрольных значений, что подтверждает защитную роль ЭПМ в формирующихся биопленках.

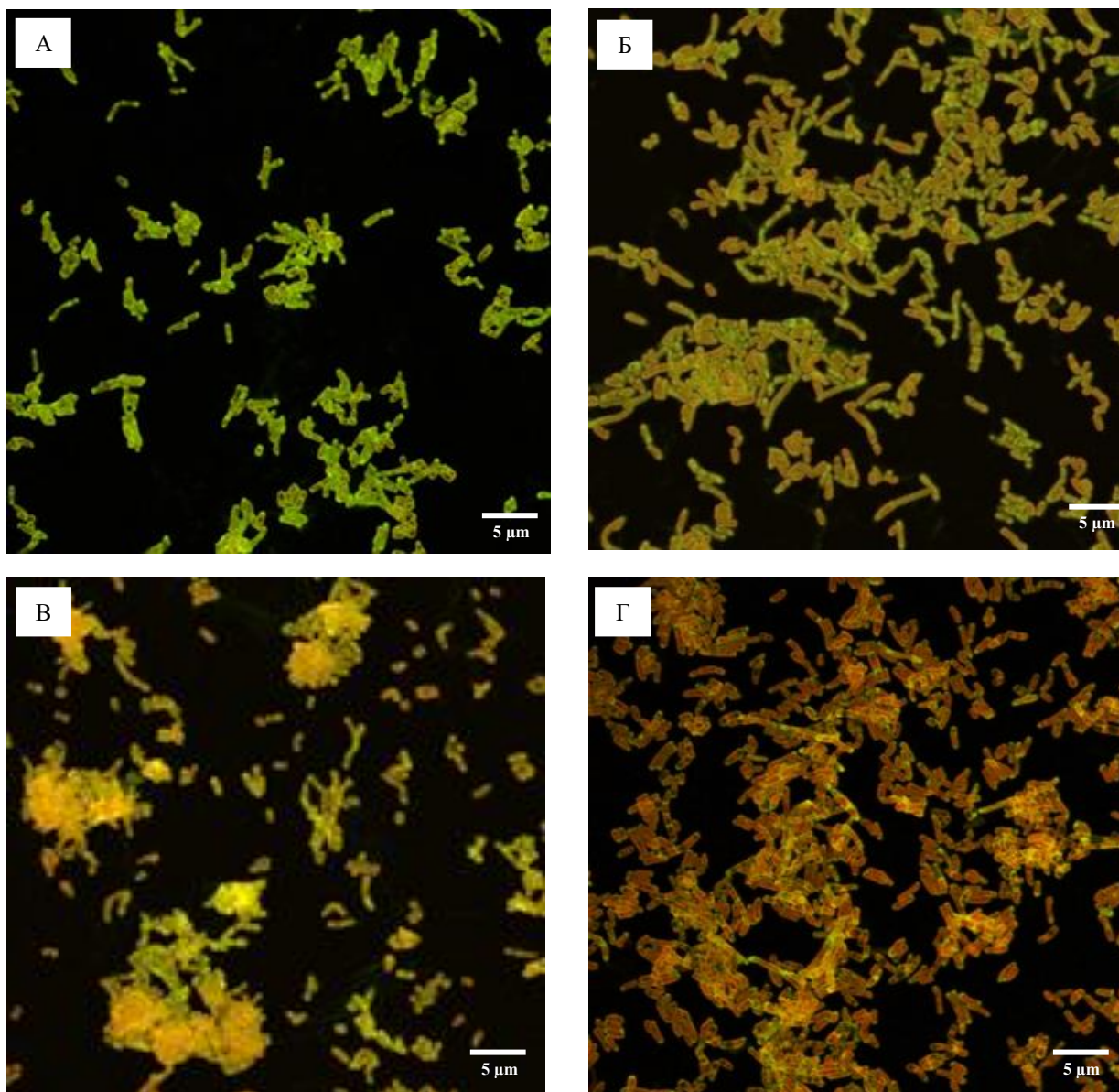


Рис. 3. КЛСМ-изображения биопленок *R. ruber* ИЭГМ 71, выращенных в минеральной среде К с 1.0% *n*-гексадекана в присутствии различных концентраций ЭНФ в течение 48 ч. и окрашенных LIVE/DEAD® для выявления живых (зеленые) и мертвых (красные) клеток.

А – Контроль, Б–Г – концентрация ЭНФ: 5.0 г/л (Б), 10 г/л (В), 15 г/л (Г)

[CLSM images of biofilms of *R. ruber* IEGM 71 grown in mineral medium K with 1.0% *n*-hexadecane in the presence of various concentrations of ENP for 48 hours and stained with LIVE/DEAD® to identify living (green) and dead (red) cells.

A – Control, Б–Г – ENP concentration: 5.0 g/l (B), 10 g/l (C), 15 g/l (D)]

Важно отметить, что общая численность клеток в формирующихся биопленках была в 2–2.5 раза выше при максимальной (15 г/л) концентрации ЭНФ по сравнению с контрольными значениями на протяжении всего (24–72 ч.) срока наблюдения (рис. 5). Это указывает на увеличение адгезивной (коадгезивной) активности родококков в присутствии высокой концентрации ЭНФ, несмотря на подавление клеточной жизнеспособности. Возможно, данный эффект обусловлен поверхностно-активными свойствами

ЭНФ, благодаря которым стимулировалась адгезивная активность родококков, аналогично действию биогенных сурфактантов, синтезируемых клетками *R. ruber*, которые формируют кондиционирующие пленки на поверхности твердых субстратов, тем самым облегчая адгезию к ним клеток родококков [Ivshina et al., 2013].

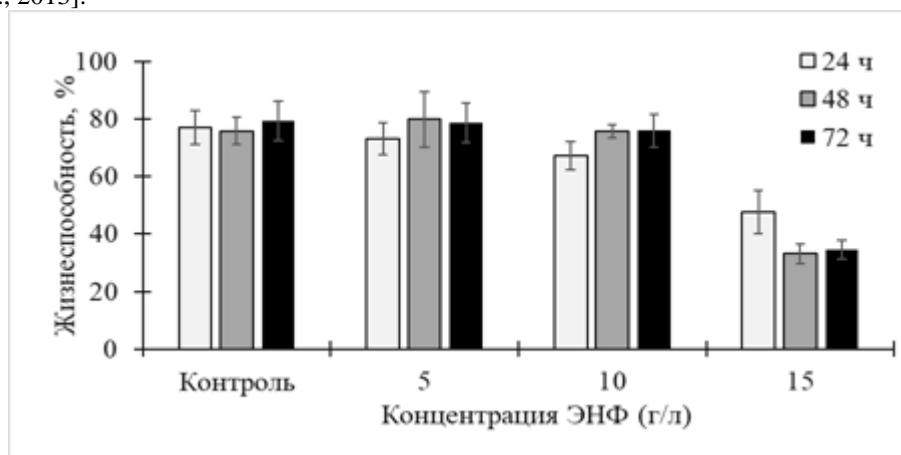


Рис. 4. Влияние ЭНФ на жизнеспособность клеток *R. ruber* ИЭГМ 71 в биопленках, выращенных в минеральной среде К с 1.0% *n*-гексадекана

[Effects of ENP on the viability of *R. ruber* IEGM 71 cells in biofilms grown in mineral medium K with 1.0% *n*-hexadecane]

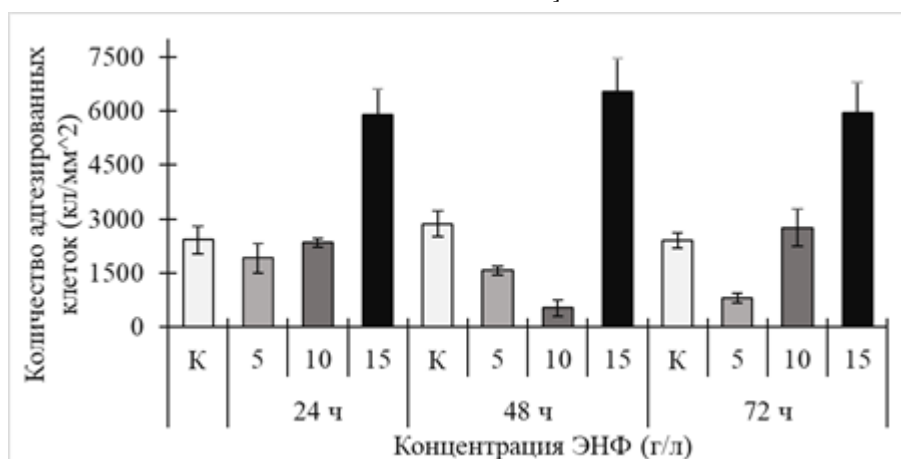


Рис.5. Динамика общей численности *R. ruber* ИЭГМ 71 в биопленках, выращенных в минеральной среде К с 1.0% *n*-гексадекана в присутствии различных концентраций ЭНФ

[Dynamics of *R. ruber* IEGM 71 cell numbers in biofilms grown in mineral medium K with 1.0% *n*-hexadecane in the presence of different ENP concentrations]

Выявленное разнонаправленное воздействие ЭНФ на планктонные культуры и формирующиеся биопленки родококков свидетельствует, с одной стороны, о комплексном характере взаимодействия поверхностно-активных ксеноэстрогенов из группы алкилфенолов с бактериальными клетками [Corvini et al., 2004; Wu, Qiu, 2011; Ruiz et al., 2013; Lu, Gan, 2014; Кузикова и др., 2019; Lara-Moreno et al., 2022], с другой стороны, о сложных, хорошо скоординированных механизмах адаптации актинобактерий рода *Rhodococcus* (включая усиленную агрегацию клеток к твердым поверхностям и коагрегацию, сверхсинтез экзополимеров) к действию токсичных ксенобиотиков [Ившина и др., 2021].

Заключение

Установлено, что актинобактерии рода *Rhodococcus* характеризуются различной степенью чувствительности к воздействию широко распространенного ксеноэстрогена – этоксилированного нонилфенола. При этом почти половина исследованных культур родококков не сохраняла жизнеспособность при концентрации ЭНФ свыше 0.5–2.0 г/л, что указывает на высокую токсичность данного соединения. По результатам кластерного анализа выявлены 4 основные группы штаммов родококков, не совпадающие с их видовой принадлежностью, с соответствующими значениями МИК ЭНФ: 0.5–2.0, 2–50, 50–125 и

>125 г/л. Обнаружено, что штаммы *R. erythropolis* в целом характеризовались более высокой чувствительностью к воздействию ЭНФ по сравнению с представителями *R. ruber* и *R. rhodochrous*. Отобраны устойчивые к высоким (МИК > 125 г/л) концентрациям ЭНФ штаммы *R. ruber* ИЭГМ 615, 1263, *R. rhodochrous* ИЭГМ 655, выделенные из нефтезагрязненных сред. Показано, что длительное (до 72 ч.) культивирование биопленок *R. ruber* ИЭГМ 71 в присутствии 15 г/л ЭНФ способствовало увеличению адгезивной активности и коагрегации бактериальных клеток (при снижении их жизнеспособности), а также синтезу экзополимерного матрикса, играющего основную роль в защите бактерий от токсичного воздействия ЭНФ. Отобранные устойчивые к ЭНФ штаммы *Rhodococcus* spp. и полученные данные могут использоваться при разработке биотехнологических методов очистки окружающей среды от ксеноэстрогенов группы алкилфенолов.

Список источников

1. Ившина И.Б., Каменских Т.Н., Ляпунов Я.Э. Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов. М.: Наука, 1994. 163 с.
2. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Костина Л.В. Адаптационные механизмы неспецифической устойчивости алканотрофных актинобактерий к ионам тяжелых металлов // Экология. 2013. Вып. 2. С. 115–123.
3. Ившина И.Б. и др. Углекислородфиксирующие родококки: особенности биологической организации под воздействием экотоллютантов. Пермь, 2021. 139 с.
4. Кузикова И.Л. и др. Влияние нонилфенолов на численность и таксономическую структуру почвенного микробного сообщества // Почвоведение. 2019. № 6. С. 722–733.
5. Куюкина М.С. и др. Влияние липидного состава клеток на формирование неспецифической антибиотикорезистентности у алканотрофных родококков // Микробиология. 2000. Т. 69, № 1. С. 62–69.
6. Ademollo N. et al. Bioaccumulation of nonylphenols and bisphenol A in the Greenland shark *Somniosus microcephalus* from the Greenland seawaters // Microchemical Journal. 2018. Vol. 136. P. 106–112.
7. Bayandina E.A. et al. Resistance of *Rhodococcus ruber* biofilms to CuO nanoparticles depending on exopolymer matrix composition // Acta Biomedica Scientifica. 2022. Vol. 7(5–1). P. 100–109.
8. Buitrón G., Torres-Bojorges A.X., Cea-Barcia G. Removal of p-nonylphenol isomers using nitrifying sludge in a membrane sequencing batch reactor // Chemical Engineering Journal. 2015. Vol. 281. P. 860–868.
9. Cladière M. et al. Modelling the fate of nonylphenolic compounds in the Seine River — part 1: Determination of in-situ attenuation rate constants // Science of the Total Environment. 2014. Vol. 468–469. P. 1050–1058.
10. Corvini P. et al. Degradation of the Radioactive and Non-labelled Branched 4(3',5'-dimethyl 3'-heptyl)-phenol Nonylphenol Isomer by *Sphingomonas* TTNP3 // Biodegradation. 2004. Vol. 15. P. 9–18.
11. Dong R., Hao J. Complex fluids of poly(oxyethylene) monoalkyl ether nonionic surfactants // Chemical Reviews. 2010. Vol. 110. P. 4978–5022.
12. Eganhouse R.P. et al. Isomer-specific determination of 4-nonylphenols using comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry // Environmental Science & Technology. 2009. Vol. 43 (24). P. 9306–9313.
13. Ferguson P.L. et al. Biogeochemistry of nonylphenol ethoxylates in urban estuarine sediments // Environmental Science & Technology. 2003. Vol. 37. P. 3499–3506.
14. Ferrer-Polonio E. et al. Effect of 4-nonylphenol on the performance and microbial community of a sequencing batch reactor // Journal of Environmental Chemical Engineering. 2022. Vol. 10, № 2. P. 107249.
15. Flemming H.C., Wuertz S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms // Nature Reviews Microbiology. 2019. Vol. 17. P. 247–260.
16. Fucic A. et al. Environmental exposure to xenoestrogens and oestrogen related cancers: reproductive system, breast, lung, kidney, pancreas, and brain // Environmental Health. 2012. Vol. 11. Article S8.
17. Hoostal M.J., Bidart-Bouzat M.G., Bouzat J.L. Local adaptation of microbial communities to heavy metal stress in polluted sediments of Lake Erie // FEMS Microbiology Ecology. 2008. Vol. 65. P. 156–168.
18. Ivshina I.B. et al. Biodegradation of drotaverine hydrochloride by free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 608 // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2012. Vol. 2, № 10. P. 2997–3006.
19. Ivshina I.B. et al. Biosurfactant-enhanced immobilization of hydrocarbon-oxidizing *Rhodococcus ruber* on sawdust // Applied Microbiology and Biotechnology. 2013. Vol. 97. P. 5315–5327.
20. Kim D., Kwak J.I., An Y.-J. Physiological response of crop plants to the endocrine-disrupting chemical nonylphenol in the soil environment // Environmental Pollution. 2019. Vol. 251. P. 573–580.
21. Korsman J.C. et al. Modeling bioaccumulation and biomagnification of nonylphenol and its ethoxylates in estuarine–marine food chains // Chemosphere. 2015. Vol. 138. P. 33–39.
22. Kovalchuk O. et al. Estrogen-induced rat breast carcinogenesis is characterized by alterations in DNA methylation, histone modifications, and aberrant microRNA expression // Cell Cycle. 2007. Vol. 6, № 16. P. 2010–2018.

23. Krivoruchko A.V., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Advanced *Rhodococcus* biocatalysts for environmental biotechnologies // *Catalysts*. 2019. Vol. 9. P. 1–19.
24. Lara-Moreno A. et al. Novel nonylphenol-degrading bacterial strains isolated from sewage sludge: Application in bioremediation of sludge // *Science of the Total Environment*. 2022. Vol. 847. Article 157647.
25. Lu Z., Gan J. Analysis, toxicity, occurrence and biodegradation of nonylphenol isomers // *Environment International*. 2014. Vol. 73. P. 334–345.
26. Materna K. et al. Removal of phenols from aqueous streams by the cloud point extraction technique with oxyethylated methyl dodecanoates as surfactants // *Environmental Science & Technology*. 2001. Vol. 35. P. 2341–2346.
27. Nazari M.T. et al. *Rhodococcus*: A promising genus of actinomycetes for the bioremediation of organic and inorganic contaminants // *Journal of Environmental Management*. 2022. Vol. 323. Article 116220.
28. Negin C., Ali S., Xie Q. Most common surfactants employed in chemical enhanced oil recovery // *Petroleum*. 2017. Vol. 3. P. 197–211.
29. Peng C. et al. Dynamics and mechanisms of bioaccumulation and elimination of nonylphenol in zebrafish // *Toxicology*. 2023. Vol. 483. Article 153375.
30. Petrick J.L. et al. Exogenous hormone use, reproductive factors and risk of intrahepatic cholangiocarcinoma among women: results from cohort studies in the Liver Cancer Pooling Project and the UK Biobank // *British Journal of Cancer*. 2020. Vol. 123. P. 316–324.
31. Priac A., et al. Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater // *Arabian Journal of Chemistry*. 2017. Vol. 10. P. S3749–S3773.
32. Quina F.H., Hinze W.L. Surfactant-mediated cloud point extractions // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 1999. Vol. 38. P. 4150–4168.
33. Różalska S. et al. Biodegradation of nonylphenol by a novel entomopathogenic *Metarhizium robertsii* strain // *Bioresource technology*. 2015. Vol. 191. P. 166–172.
34. Ruiz Y. et al. Biodegradation of polyethoxylated nonylphenols // *ISRN microbiology*. 2013. Article 284950.
35. Seralini G.E., Jungers G. Endocrine disruptors also function as nervous disruptors and can be renamed endocrine and nervous disruptors // *Toxicology reports*. 2021. Vol. 8. P. 1538–1557.
36. Shen C. et al. Effect of benzo[a]pyrene on detoxification and the activity of antioxidant enzymes of marine microalgae // *Journal of Ocean University of China*. 2016. Vol. 15. P. 303–310.
37. Soares A. et al. Aerobic biodegradation of nonylphenol by cold-adapted bacteria // *Biotechnology Letters*. 2003. Vol. 25. P. 731–738.
38. Tian K. et al. Mechanism of 17 β -estradiol degradation by *Rhodococcus equi* via the 4,5-seco pathway and its key genes // *Environmental Pollution*. 2022. Vol. 312. 120021.
39. Villemur R. et al. Biodegradation of endocrine disruptors in solid-liquid two-phase partitioning systems by enrichment cultures // *Applied and Environmental Microbiology*. 2013. Vol. 79(15). P. 4701–4711.
40. Wang Y. Degradation of 17 β -estradiol and products by a mixed culture of *Rhodococcus equi* DSSKP-R-001 and *Comamonas testosteroni* QYY20150409 // *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2019. Vol. 33, № 1. P. 268–277.
41. Watanabe W. et al. Bacterial Degradation and Reduction in the Estrogen activity of 4-nonylphenol // *Bio-control Science*. 2012. Vol. 17. P. 143–147.
42. White G.F. Bacterial biodegradation of ethoxylated surfactants // *Pesticide Science*. 1993. Vol. 37. P. 159–166.
43. Wilmaerts D. et al. General mechanisms leading to persister formation and awakening // *Trends Genet.* 2019. Vol. 35. P. 401–411.
44. Writer J., Joseph N.R., Larry J.B. Role of biofilms in sorptive removal of steroidal hormones and 4-nonylphenol compounds from streams // *Environmental Science & Technology*. 2011. Vol. 45. P. 7275–7283.
45. Wu F.F., Qiu L.F. Kinetic study on the biodegradation of nonylphenol by *Rhodotorula* sp. // *Advanced Materials Research*. 2011. Vol. 233–235. P. 575–578.
46. Yuan S.Y., Yu C.H., Chang B.V. Biodegradation of nonylphenol in river sediment // *Environmental Pollution*. 2004. Vol. 127. P. 425–430.

References

1. Ivshina I.B., Kamenskih T.N., Lyapunov Ya.E. *Katalog štammov Regional'noj profiurovannoj kollekcii a;anotrofnich mikroorganizmov* [Catalogue of strains of the Regional profiled collection of alkanotrophic microorganisms]. Moscow, Nauka Publ., 1994. 163 p. (In Russ.).
2. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Kostina L.V. [Adaptive mechanisms of nonspecific resistance of alkanotrophic actinobacteria to heavy metal ions]. *Èkologija*. Iss. 2 (2013): pp. 115-123. (In Russ.).

3. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Kamenskih T.N., Krivoruchko A.V., Tyumina E.A., Elkin A.A. *Uglevodородokisljajušćie rodokokki* [Hydrocarbon-oxidizing rhodococci: features of biological organization under the influence of eco-pollutants]. Perm, 2021. 139 p. (In Russ.).
4. Kuzikova I.L., Zaytseva T.B., Kichko A.A., Zinoveva S.V., Russu A.D., Mayachkina N.V., Medvedeva N.G. [Effect of nonylphenols on the abundance and taxonomic structure of the soil microbial community]. *Počvovedenie*. No. 6 (2019): pp. 722-733. (In Russ.).
5. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Rychkova M.I., Chumakov O.B. [Effect of the cell lipid composition on the formation of nonspecific antibiotic resistance in alkanotrophic rhodococci]. *Mikrobiologija*. V. 69, No. 1 (2000): pp. 62-69. (In Russ.).
6. Ademollo N., Patrolecco L., Rauseo J., Nielsen J., Corsolini S., Bioaccumulation of nonylphenols and bisphenol A in the Greenland shark *Somniosus microcephalus* from the Greenland seawaters. *Microchemical Journal*. V. 136 (2018): pp. 106-112.
7. Bayandina E.A., Glebov G.G., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Resistance of *Rhodococcus ruber* biofilms to CuO nanoparticles depending on exopolymer matrix composition. *Acta Biomedica Scientifica*. V. 7(5-1) (2022): pp. 100-109.
8. Buitrón G., Torres-Bojorges A.X., Cea-Barcia G. Removal of p-nonylphenol isomers using nitrifying sludge in a membrane sequencing batch reactor. *Chemical Engineering Journal*. V. 281 (2015): pp. 860-868.
9. Cladière M., Bonhomme C., Vilmin L., Gasperi J., Flipo N., Tassin B. Modelling the fate of nonylphenolic compounds in the Seine River — part 1: Determination of in-situ attenuation rate constants. *Science of the Total Environment*. V. 468-469 (2014): pp. 1050-1058.
10. Corvini P., Vinken R., Hommes G, Schmidt D., Dohmann M. Degradation of the Radioactive and Non-labelled Branched 4(3',5'-dimethyl 3'-heptyl)-phenol Nonylphenol Isomer by *Sphingomonas* TTNP3. *Biodegradation*. V. 15 (2004): pp. 9-18.
11. Dong R., Hao J. Complex fluids of poly(oxyethylene) monoalkyl ether nonionic surfactants. *Chemical Reviews*. V. 110 (2010): pp. 4978-5022.
12. Eganhouse R.P., Pontolillo J., Gaines R.B., Frysinger G.S., Gabriel, F.L.P., Kohler H.-P.E., Giger W., Barber L.B. Isomer-specific determination of 4-nonylphenols using comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Environmental Science & Technology*. V. 43 (24) (2009): pp. 9306-9313.
13. Ferguson P.L., Bopp R.F., Chillrud S.N., Aller R.C., Brownawell B.J. Biogeochemistry of nonylphenol ethoxylates in urban estuarine sediments. *Environmental Science & Technology*. V. 37 (2003): pp. 3499-3506.
14. Ferrer-Polonio E., Fernández-Navarro J., Mendoza-Roca J.A., Bes-Piá A., Alonso-Molina J.L., Effect of 4-nonylphenol on the performance and microbial community of a sequencing batch reactor. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. V. 10, No. 2 (2022): p. 107249.
15. Flemming H.C, Wuertz S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. V. 17 (2019): pp. 247-260.
16. Fucic A., Gamulin M., Ferencic Z., Katic J., Krayer von Krauss M., Bartonova A., Merlo D.F. Environmental exposure to xenoestrogens and oestrogen related cancers: reproductive system, breast, lung, kidney, pancreas, and brain. *Environmental Health*. V. 11 (2012): Article S8.
17. Hoostal M.J., Bidart-Bouzat M.G., Bouzat J.L. Local adaptation of microbial communities to heavy metal stress in polluted sediments of Lake Erie. *FEMS Microbiology Ecology*. V. 65 (2008): pp. 156-168.
18. Ivshina I.B., Richkova M.I. Mukhutdinova A.N., Karpenko Ju.N. Biodegradation of drotaverine hydrochloride by free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 608. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. V. 28, No. 10 (2012): pp. 2997-3006.
19. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Plekhov O.A., Naimark O.B., Podorozhko E.A., Lozinsky V.I. Biosurfactant-enhanced immobilization of hydrocarbon-oxidizing *Rhodococcus ruber* on sawdust. *Applied Microbiology and Biotechnology*. V. 97 (2013): pp. 5315-5327.
20. Kim D., Kwak J.I., An Y.-J. Physiological response of crop plants to the endocrine-disrupting chemical nonylphenol in the soil environment. *Environmental Pollution*. V. 251 (2019): pp. 573-580.
21. Korsman J.C., Schipper A.M., de Vos M.G, van den Heuvel-Greve M.J., Vethaak A.D., de Voogt P., Hendriks A.J. Modeling bioaccumulation and biomagnification of nonylphenol and its ethoxylates in estuarine-marine food chains. *Chemosphere*. V. 138 (2015): pp. 33-39.
22. Kovalchuk O., Tryndyak V.P., Montgomery B., Boyko A., Kutanzi K., Zemp F., Warbritton A.R., Latendresse J.R, Kovalchuk I., Beland F.A., Pogribny I.P. Estrogen-induced rat breast carcinogenesis is characterized by alterations in DNA methylation, histone modifications, and aberrant microRNA expression. *Cell Cycle*. V. 6, No. 16 (2007): pp. 2010-2018.
23. Krivoruchko A.V., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Advanced *Rhodococcus* biocatalysts for environmental biotechnologies. *Catalysts*. V. 9 (2019): pp. 1-19.

24. Lara-Moreno A., Aguilar-Romero I., Rubio-Bellido M., Madrid F., Villaverde J., Santos J.L., Alonso E., Morillo E. Novel nonylphenol-degrading bacterial strains isolated from sewage sludge: Application in bioremediation of sludge. *Science of the Total Environment*. V. 847 (2022): Article 157647.
25. Lu Z., Gan J. Analysis, toxicity, occurrence and biodegradation of nonylphenol isomers. *Environment International*. V. 73 (2014): pp. 334-345.
26. Materna K., Milosz I., Miesiac I., Cote G., Szymanowski J. Removal of phenols from aqueous streams by the cloud point extraction technique with oxyethylated methyl dodecanoates as surfactants. *Environmental Science & Technology*. V. 35 (2001): pp. 2341-2346.
27. Nazari M.T., Simon V., Strieder Machado B., Crestani L., Marchezi G., Concolato G., Ferrari V., Colla L.M., Piccin J.S. *Rhodococcus*: A promising genus of actinomycetes for the bioremediation of organic and inorganic contaminants. *Journal of Environmental Management*. V. 323 (2022): Article 116220.
28. Negin C., Ali S., Xie Q. Most common surfactants employed in chemical enhanced oil recovery. *Petroleum*. V. 3 (2017): pp. 197-211.
29. Peng C., Zhou S., Zhang Y., Zhang H., Zhang W., Ling S., Hu S. Dynamics and mechanisms of bioaccumulation and elimination of nonylphenol in zebrafish. *Toxicology*. V. 483 (2023): Article 153375.
30. Petrick J.L., McMenamin U.C., Zhang X., Zeleniuch-Jacquotte A., Wactawski-Wende J., Simon T.G., Sinha R., Sesso H.D., Schairer C., Rosenberg L., Rohan T.E., Robien K., Purdue M.P., Poynter J.N., Palmer J.R., Lu Y., Linet M.S., Liao L.M., Lee I-M., Koshiol J., Kitahara C.M., Kirsh V.A., Hofmann J.N., Graubard B.I., Giovannucci E., Gaziano J.M., Gapstur S.M., Freedman N.D., Florio A.A., Chong D.Q., Chen Y., Chan A.T., Buring J.E., Beane Freeman L.E., Bea J.W., Cardwell C.R., Campbell P.T., McGlynn K.A. Exogenous hormone use, reproductive factors and risk of intrahepatic cholangiocarcinoma among women: results from cohort studies in the Liver Cancer Pooling Project and the UK Biobank. *British Journal of Cancer*. V. 123 (2020): pp. 316-324.
31. Priac A., Morin-Crini N., Druart C., Gavoille S., Bradu C., Lagarrigue C., Torri G., Winterton P., Crini G. Alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates in water and wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*. V. 10 (2017): pp. S3749-S3773.
32. Quina F.H., Hinze W.L. Surfactant-mediated cloud point extractions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. V. 38 (1999): pp. 4150-4168.
33. Różalska S., Soboń A., Pawłowska J., Wrzosek M., Długoński J. Biodegradation of nonylphenol by a novel entomopathogenic *Metarhizium robertsii* strain. *Bioresource technology*. V. 191 (2015): pp. 166-172.
34. Ruiz Y., Medina L., Borusiak M., Ramos N., Pinto G., & Valbuena O. Biodegradation of polyethoxylated nonylphenols. *ISRN microbiology*. (2013): Article 284950.
35. Seralini G. E., Jungers G. Endocrine disruptors also function as nervous disruptors and can be renamed endocrine and nervous disruptors. *Toxicology reports*. V. 8 (2021): pp. 1538-1557.
36. Shen C., Miao J., Li Y., Pan L. Effect of benzo[a]pyrene on detoxification and the activity of antioxidant enzymes of marine microalgae. *Journal of Ocean University of China*. V. 15 (2016): pp. 303-310.
37. Soares A., Guieysse B., Delgado O., Mattiasson B. Aerobic biodegradation of nonylphenol by cold-adapted bacteria. *Biotechnology Letters*. V. 25 (2003): pp. 731-738.
38. Tian K., Meng Q., Li S., Chang M., Meng F., Yu Y., Li H., Qiu Q., Shao J., Huo H., Mechanism of 17 β -estradiol degradation by *Rhodococcus equi* via the 4,5-seco pathway and its key genes. *Environmental Pollution*. V. 312 (2022): 120021.
39. Villemur R., Dos Santos S.C., Ouellette J., Juteau P., Lépine F., Déziel, E. Biodegradation of endocrine disruptors in solid-liquid two-phase partitioning systems by enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 79(15) (2013): pp. 4701-4711.
40. Wang Y. Degradation of 17 β -estradiol and products by a mixed culture of *Rhodococcus equi* DSSKP-R-001 and *Comamonas testosteroni* QYY20150409. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. V. 33, No. 1 (2019): pp. 268-277.
41. Watanabe W., Hori Y., Nishimura S., Takagi A., Kikuchi M., Sawai J. Bacterial Degradation and Reduction in the Estrogen activity of 4-nonylphenol. *Biocontrol Science*. V. 17 (2012): pp. 143-147.
42. White G. F. Bacterial biodegradation of ethoxylated surfactants. *Pesticide Science*. V. 37 (1993): pp. 159-166.
43. Wilmaerts D., Windels E.M., Verstraeten N., Michiels J. General mechanisms leading to persister formation and awakening. *Trends Genet*. V. 35 (2019): pp. 401-411.
44. Writer J., Joseph N.R., Larry J.B. Role of biofilms in sorptive removal of steroidal hormones and 4-nonylphenol compounds from streams. *Environmental Science & Technology*. V. 45 (2011): pp. 7275-7283.
45. Wu F.F., Qiu L.F. Kinetic study on the biodegradation of nonylphenol by *Rhodotorula* sp. *Advanced Materials Research*. V. 233-235 (2011): pp. 575-578.
46. Yuan S.Y., Yu C.H., Chang B.V. Biodegradation of nonylphenol in river sediment. *Environmental Pollution*. V. 127 (2004): pp. 425-430.

Статья поступила в редакцию 19.10.2023; одобрена после рецензирования 30.10.2023; принята к публикации 20.11.2023.

The article was submitted 19.10.2023; approved after reviewing 30.10.2023; accepted for publication 20.11.2023.

Информация об авторах

Е. А. Баяндина – студент биологического факультета;

А. В. Поздеева – студент биологического факультета;

М. С. Куюкина – д-р биол. наук, профессор кафедры микробиологии и иммунологии; ведущий научный сотрудник лаборатории алканотрофных микроорганизмов;

И. Б. Ившина – д-р биол. наук, профессор, академик РАН, профессор кафедры микробиологии и иммунологии; заведующая лабораторией алканотрофных микроорганизмов.

Information about the authors

E. A. Bayandina – Student at the Department of Microbiology and Immunology, Perm State University;

A. V. Pozdeeva – Student at the Department of Microbiology and Immunology, Perm State University;

M. S. Kuyukina – Dr. Sc. (Biol.), Professor at the Department of Microbiology and Immunology; Leading Research Officer;

I. B. Ivshina – Dr. Sc. (Biol.), Professor, Academician of RAS, Professor at the Department of Microbiology and Immunology; Head of the Laboratory.

Вклад авторов:

Баяндина Е. А. – написание исходного текста; статистическая обработка материала; выводы.

Поздеева А. В. – методология; доработка текста.

Куюкина М. С. – научное руководство; развитие методологии; написание исходного текста; итоговые выводы.

Ившина И. Б. – концептуализация исследования; редактирование текста.

Contribution of the authors:

Bayandina E. A. – writing the draft; statistical processing of the material; conclusions.

Pozdeeva A. V. – methodology; followon revision of the text.

Kuyukina M. S. – scientific management; research concept; methodology development; writing the draft; final conclusions.

Ivshina I. B. – conceptualization of research; text editing.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.26: 579.222

doi: 10.17072/1994-9952-2023-4-349-355

Бактерии-деструкторы дибутилфталата, выделенные из ризосферы мятлика лугового (*Poa pratensis* L.)

Екатерина Сергеевна Корсакова^{1✉, 2}, Анна Александровна Пьянкова³,
Елена Генриховна Плотникова^{4, 5}

^{1, 3, 4} Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

^{2, 5} Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

^{1✉, 2} camomille-08@mail.ru

³ annpjankva@mail.ru

^{4, 5} peg_el@mail.ru

Аннотация. Изучена способность трех бактериальных штаммов класса *Actinomycetes*, выделенных из ризосферы растений мятлика лугового (*Poa pratensis* L.), произрастающих на территории промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей (Пермский край), к росту на дибутилфталате (ДФФ) в качестве единственного источника углерода и энергии. На основе анализа гена 16S рРНК показано, что штамм Rh7bel проявлял сходство на уровне 100% с *Rhodococcus wratislaviensis* NBRC 100605^T, а штаммы NKDBFbel и NKDBFgelt филогенетически близки двум типовым штаммам видов *Pseudarthrobacter oxydans* и *Pseudarthrobacter polychromogenes* (сходство 99.83%). Штаммы-деструкторы ДФФ характеризуются эффективным ростом на ключевом метаболите разложения ДФФ – орто-фталевой кислоте, и утилизацией этого метаболита. Штамм *Rhodococcus* sp. Rh7bel демонстрировал наиболее высокие показатели утилизации ДФФ: максимальную удельную скорость потребления субстрата 0.018±0.002 ч⁻¹, утилизацию субстрата 70.7% за 72 ч. (начальная концентрация ДФФ 0.2 г/л). Таким образом, ризосферные штаммы-деструкторы ДФФ *Rhodococcus* sp. Rh7bel, *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFbel и NKDBFgelt являются перспективными для дальнейшего изучения и разработки технологии фиторемедиации почв, загрязненных фталатами.

Ключевые слова: мятлик луговой, ризосфера, дибутилфталат, деструкция, *Rhodococcus*, *Pseudarthrobacter*

Для цитирования: Корсакова Е. С., Пьянкова А. А., Плотникова Е. Г. Бактерии-деструкторы дибутилфталата, выделенные из ризосферы мятлика лугового (*Poa pratensis* L.) // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 4. С. 349–355. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-349-355>.

Благодарности: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-24-00308).

MICROBIOLOGY

Original article

Dibutyl phthalate degrading bacteria isolated from the rhizosphere of bluegrass (*Poa pratensis* L.)

Ekaterina S. Korsakova^{1✉, 2}, Anna A. Pyankova³, Elena G. Plotnikova^{4, 5}

^{1, 3, 4} Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia

^{2, 5} Perm State University, Perm, Russia

^{1✉, 2} camomille-08@mail.ru

³ annpjankva@mail.ru

^{4, 5} peg_el@mail.ru

Abstract. The ability of three bacterial strains of the class *Actinomycetes*, isolated from the rhizosphere of bluegrass (*Poa pratensis* L.) plants growing in the industrial development area of the Verkhnekamsk salt deposit (Perm krai), to grow on dibutyl phthalate (DBP) as the only source of carbon and energy was studied. Based on 16S rRNA gene analysis, it was shown that the strain Rh7bel showed similarity at 100% level with *Rhodococcus wratislaviensis* NBRC 100605^T, and strains NKDBFbel and NKDBFgelt are phylogenetically close to two type

strains of the species *Pseudarthrobacter oxydans* and *Pseudarthrobacter polychromogenes* (99.83% similarity). DBP-degrading strains are characterized by efficient growth on the key metabolite of DBP degradation, *ortho*-phthalic acid, and utilization of this metabolite. The strain *Rhodococcus* sp. Rh7bel demonstrated the highest rates of DBP utilization: the maximum specific substrate consumption rate was $0.018 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$, substrate utilization was 70.7% in 72 hours (initial DBP concentration 0.2 g/L). Thus, rhizosphere DBP-degrading strains *Rhodococcus* sp. Rh7bel, *Pseudarthrobacter* spp. NKDBFbel and NKDBFgelt are promising for further study and development of technology for phytoremediation of soils contaminated with phthalates.

Keywords: *Poa pratensis*, rhizosphere, dibutyl phthalate, degradation, *Rhodococcus*, *Pseudarthrobacter*

For citation: Korsakova E. S., Pyankova A. A., Plotnikova E. G. [Dibutyl phthalate degrading bacteria isolated from the rhizosphere of bluegrass (*Poa pratensis* L.)]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2023): pp. 349-355. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-349-355>.

Acknowledgments: the work was carried out within the Russian Science Foundation (project No. 23-24-00308).

Введение

В настоящее время вследствие интенсивного производства и применения синтетических полимеров наблюдается широкое распространение эфиров фталевой кислоты (фталатов) в объектах окружающей среды. Наиболее широко используется в различных областях промышленности один из эфиров фталевой кислоты – дибutilфталат (ДБФ). Он обладает высокой растворяющей способностью и низкой вязкостью, что обуславливает его применение для изменения свойств полимеров с целью повышения их эластичности, морозостойкости. ДБФ применяется в резинотехническом производстве, при изготовлении искусственных пленок, кабельных пластикатов, эфира целлюлозы, линолеумов, лаков и искусственных смол. Фталаты и их метаболиты признаны потенциально опасными для человека и животных, т.к. обладают гепатотоксичными, тератогенными и канцерогенными свойствами [Liang et al., 2008].

Наличие значительного количества фталатов (в том числе ДБФ) выявлено в районах интенсивной работы предприятий горнодобывающей промышленности. Так, данные соединения обнаружены в глинисто-солевых шламах, избыточных рассолах и отходах калийного производства вследствие использования в технологическом цикле обогащения калийных руд реагентов (оксигетилированных жирных кислот, нефтепродуктов, диоксановых спиртов и др.), продуктами трансформации которых являются фталаты [Бачурин, Одинцова, 2006].

Известно, что период полураспада ДБФ в окружающей среде составляет от нескольких месяцев до 20 лет, и основную роль в процессе разложения этого соединения выполняют бактерии-деструкторы [Liang et al., 2008]. Среди штаммов, осуществляющих аэробную деструкцию ДБФ, обнаружены бактерии различных филумов, наиболее часто встречаются представители родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Gordonia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* [Liang et al., 2008; Jin et al., 2010; Stanislauskiene et al., 2011; Капачија, Sivashanmugam, Pakshirajan, 2022]. Метаболические пути разложения эфиров фталевой кислоты аэробными бактериями сочетают два процесса – первичную деградацию диэфиров фталата до моноэфиров и последующую их деструкцию до *ortho*-фталевой кислоты (ФК), являющейся центральным метаболитом деструкции большинства фталевых эфиров. Дальнейшее разложение ФК осуществляется через образование протокатеховой кислоты (в качестве ключевого метаболита) до основных продуктов жизнедеятельности микробной клетки [Eaton, 2001; Liang et al., 2008; Vamsee-Krishna, Phale, 2008; Kasai et al., 2019].

Фиторемедиация становится все более популярной и востребованной технологией восстановления загрязненных почв, поскольку является высокоэффективным, надежным, малозатратным и экологически чистым методом. При этом для эффективной очистки почв предполагается использование устойчивых растительно-микробных ассоциаций, содержащих в ризосфере бактерии, способные осуществлять деструкцию органических поллютантов, присутствующих в почве [Wenzel, 2009; Randika et al., 2022]. В ряде исследований показано положительное влияние высадки растений на очистку почвы от фталатов [Li et al., 2014; Liao, Nishikawa, Shih, 2019; Wu et al., 2019]. Однако исследования микроорганизмов ризосферы растений, выращенных на загрязненной фталатами почве, на сегодняшний день крайне немногочисленны [Zhang et al., 2015; Wu et al., 2019].

Цель работы – характеристика бактерий-деструкторов дибutilфталата, выделенных из ризосферы растений мятлика лугового, произрастающих в районе промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей (Пермский край).

Материалы и методы

Объекты исследования. Из рабочей коллекции микроорганизмов Лаборатории микробиологии техногенных экосистем Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН для исследования были отобраны 76 штаммов, выделенных из ризосферы растений, произрастающих на территории Верхнекамского промышленного региона (Пермский край).

Также в работе использованы два штамма NKDBFbel и NKDBFgelt, полученные из накопительной культуры при инкубировании на ДБФ в качестве субстрата. Штаммы были выделены из образца ризосферы мятлика лугового (*Poa pratensis* L.), отобранного вблизи солеотвала (г. Соликамск, Пермский край, Россия).

Среды и условия культивирования. Для культивирования бактерий использовали минеральную среду Раймонда (МСР) следующего состава (г/л): NH_4NO_3 – 2.0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2, K_2HPO_4 – 2.0, Na_2HPO_4 – 3.0, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, Na_2CO_3 – 0.1, дополненную 1%-ным раствором $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 2 мл/л и 1%-ным раствором $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1 мл/л среды [Raymond, 1961]. В качестве субстратов использовали ФК и ДБФ в концентрации 1.0 г/л. Для приготовления богатой среды Раймонда (БСР) в МСР добавляли 5 г/л триптона («VWR Life Science Amresco», США) и 2.5 г/л дрожжевого экстракта («Biospringer», Франция) в качестве ростовых субстратов. Для приготовления плотных сред вносили агар («Helicon», Россия) до конечной концентрации 15 г/л.

Морфологические характеристики бактерий определяли при выращивании на агаризованной БСР. Культивирование осуществляли при температуре 28°C. Описание морфологии колоний проводили на седьмой день культивирования. Для микроскопирования клеток использовали 48-часовые культуры бактерий [Методы ..., 1983].

Секвенирование и анализ генов 16S рРНК. Определение нуклеотидных последовательностей проводили с применением набора реактивов «GenSeq-100» («Синтол», Россия) на автоматическом секвенаторе Нанофор 05 («Синтол», Россия) согласно рекомендациям производителя. Анализ полученных последовательностей осуществляли с использованием программ Sequence Scanner v. 2.0, MEGA v. 11.0 (<http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологов генов 16S рРНК осуществляли по международным базам данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>).

Рост бактерий на ФК и ДБФ оценивали при культивировании в жидкой МСР. Субстрат вносили до конечной концентрации 1.0 г/л. Инокулятом служила культура, выращенная на агаризованной БСР при 28°C. Биомассу бактерий ресуспендировали в МСР, полученную суспензию бактериальных клеток ($\text{ОП}_{600}=1.0$) добавляли в 100 мл среды в количестве 1% об./об. Культивирование штаммов бактерий осуществляли в колбах объемом 250 мл (объем среды – 100 мл) на термостатируемом шейкере Environmental Shaker Incubator ES-20/60 («BioSan», Латвия) при температуре 28°C и скорости вращения 140 об/мин. Оптическую плотность (ОП) культуральной жидкости определяли на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при длине волны 600 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Расчет удельной скорости роста (μ , ч^{-1}) проводили по стандартной формуле

$$\mu = (\ln B_2 - \ln B_1) / (t_2 - t_1),$$

где B_1 и B_2 – оптические плотности культуры в моменты времени t_1 и t_2 соответственно [Нетрусов, 2005].

Оценку разложения ДБФ бактериями осуществляли методом газожидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ГЖХ-МС). Штаммы выращивали в среде МСР, содержащей дибутилфталат (1.0 г/л), клетки собирали центрифугированием (9 000 об/мин, 5 мин.) и отмывали при помощи МСР. Отмытые дважды клетки ($\text{ОП}_{600}=2.0$) инокулировали в 1 мл МСР с ДБФ (0.2 г/л) и инкубировали при 28°C в течение трех суток при аэрации на роторном шейкере (150 об/мин). Экстракцию ДБФ осуществляли равным объемом гексана в течение 120 мин. на шейкере при 100 об/мин. Остаточную воду удаляли из образцов путем введения безводного сульфата натрия. Анализ проводили на газовом хроматографе-масс-спектрометре «Agilent» 7890В модель G3440В («Agilent», США), с кварцевой колонкой RESTEK RTx-5MS («Restek», США). Анализ хроматограмм проводили с использованием программы MassHunter Qualitative Analysis 10.0 («Agilent», США.). Идентификацию ДБФ проводили путем сравнения времени выхода пиков со временем выхода пиков контрольного соединения, а также по хромато-масс спектрам.

Расчет удельной скорости утилизации (μ , сут^{-1}) проводили по стандартной формуле

$$\mu = (\ln C_1 - \ln C_2) / (t_2 - t_1),$$

где C_1 , C_2 – концентрация субстрата в начальный и конечный моменты времени t_1 и t_2 соответственно [Нетрусов, 2005].

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты были выполнены в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel 2007.

Результаты и их обсуждение

В ходе проведенной работы 76 штаммов, выделенные из образцов ризосферы растений с территории солеразработок (г. Березники, г. Соликамск, Пермский край), были исследованы на способность к росту на ДБФ и ФК – ключевом метаболите бактериального разложения ДБФ. В результате из 14 активных

деструкторов ФК только один штамм (Rh7bel), изолированный из ризосферы мятлика лугового (*Poa pratensis* L.), был способен к росту на дибутилфталате как единственном источнике углерода и энергии. При культивировании на агаризованной БСР штамм Rh7bel формировал округлые непрозрачные колонии диаметром 1.5–2.5 мм с ровным краем, гладкой матовой поверхностью, выпуклым профилем, мелкозернистой структурой и мягкой консистенцией. Клетки штамма грамположительные, неподвижные, в стационарной фазе роста представлены длинными палочками. На основе анализа фрагмента гена 16S рРНК (808 п.н.) было установлено, что штамм Rh7bel проявлял сходство на уровне 100% с *Rhodococcus wratislaviensis* NBRC 100605^T.

Штаммы-деструкторы дибутилфталата NKDBFbel и NKDBFgelt имели округлые полупрозрачные колонии диаметром 2–4 мм с ровным краем, гладкой блестящей поверхностью, выпуклым профилем, однородной структурой и мягкой консистенцией. Штамм NKDBFbel на агаризованной БСР формировал колонии белого цвета, а штамм NKDBFgelt – желтого цвета. Клетки обоих штаммов грамположительные, неподвижные, в стационарной фазе представлены утолщенными короткими палочками. На основе анализа фрагмента гена 16S рРНК штаммы NKDBFbel и NKDBFgelt по гену 16S рРНК (594 и 602 п.н., соответственно) имели сходство на уровне 99.83% с двумя типовыми штаммами – *Pseudarthrobacter oxydans* DSM 20119^T и *Pseudarthrobacter polychromogenes* DSM 20136^T.

Исследованы ростовые характеристики штаммов Rh7bel, NKDBFbel и NKDBFgelt при росте на ДБФ и ФК в качестве субстратов (рис. 1, 2; таблица). Штаммы имели высокие показатели максимальной ОП при росте на ФК (>1.0), но только у штамма NKDBFgelt были зарегистрированы сравнимые значения ОП при росте на ДБФ (таблица). Максимальные значения удельной скорости роста культуры выявлены у штамма NKDBFgelt при росте на обоих субстратах. Штамм *Rhodococcus* sp. Rh7bel демонстрировал высокие показатели при росте на ФК, однако в процессе инкубирования на ДБФ клетки штамма формировали конгломераты, что могло повлиять на регистрацию низких значений параметров роста культуры (рис. 1, 2; таблица).

Параметры роста штаммов Rh7bel, NKDBFbel, NKDBFgelt на ДБФ и утилизации ДБФ [Growth parameters of strains Rh7bel, NKDBFbel, NKDBFgelt and DBP utilization]

Параметры роста	<i>Rhodococcus</i> sp. Rh7bel		<i>Pseudarthrobacter</i> sp. NKDBFbel		<i>Pseudarthrobacter</i> sp. NKDBFgelt	
	ФК	ДБФ	ФК	ДБФ	ФК	ДБФ
Ростовой субстрат, 1.0 г/л	ФК	ДБФ	ФК	ДБФ	ФК	ДБФ
Удельная скорость роста, ч ⁻¹	0.041± 0.003	0.002± 0.001	0.008± 0.001	0.003± 0.001	0.054± 0.003	0.016± 0.002
Максимальное значение ОП ₆₀₀	1.10	0.27	1.04	0.46	1.25	1.11
Лаг-фаза роста, ч	24	78	78	24	54	24
Удельная скорость утилизации, ч ⁻¹	н.о.	0.018± 0.002	н.о.	0.008± 0.002	н.о.	0.009± 0.003
Утилизация, %	н.о.	70.7±0.4	н.о.	43.3±0.3	н.о.	45.1±0.3

Примечание: н.о. – не определяли.

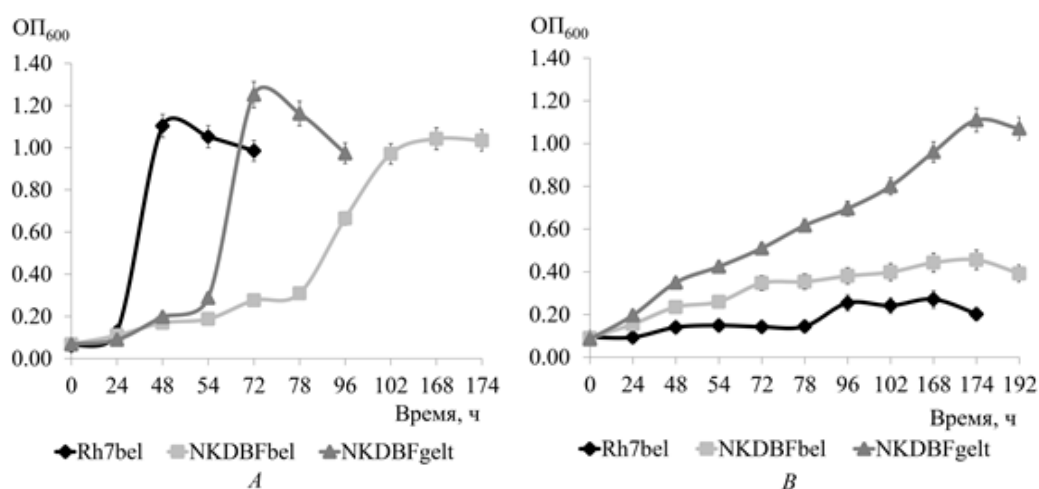


Рис. 1. Рост штаммов-деструкторов на ФК (А) и ДБФ (В) (1.0 г/л) в МСР

[Growth of destructor strains on FA (A) and DBP (B) (1.0 g/L) in MMR]

С использованием метода ГЖХ-МС исследована способность штаммов к утилизации ДБФ (рис. 2). Наиболее высокие показатели утилизации субстрата (70.7% за 72 ч.) и максимальная удельная скорость потребления дибутилфталата ($0.018 \pm 0.002 \text{ ч}^{-1}$) зафиксированы у штамма *Rhodococcus* sp. Rh7bel. Два других штамма-деструктора рода *Pseudarthrobacter* показали снижение количества ДБФ лишь на 43–45% за 72 ч. эксперимента.

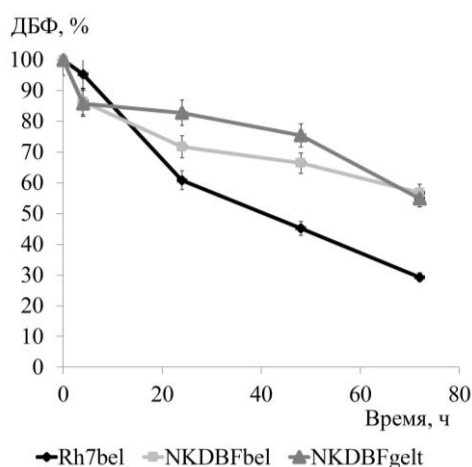


Рис. 2. Утилизация ДБФ (0.2 г/л) исследуемыми штаммами
[Utilization of DBP (0.2 g/L) by the studied strains]

На основании известных путей деструкции эфиров фталевых кислот бактериями рода *Rhodococcus* и *Pseudarthrobacter* можно предположить, что разложение дибутилфталата исследуемыми штаммами осуществляется до монобутилфталата, затем до образования ключевых метаболитов – фталевой кислоты и протокатеховой кислоты, которые далее метаболизируются в цикле трикарбоновых кислот [Choi et al., 2005; Jin et al., 2010; Chen et al., 2021].

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что штаммы-деструкторы *Rhodococcus* sp. Rh7bel, *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFbel и NKDBFgelt, выделенные из ризосферы растений мятлика лугового (*Poa pratensis* L.), произрастающих на почвах, загрязненных отходами калийного производства, способны к эффективному росту на среде с дибутилфталатом в качестве субстрата. Активность штаммов-деструкторов ДБФ подтверждена ростом на ключевом метаболите разложения ДБФ – орто-фталевой кислоте, и эффективной утилизацией этого метаболита. Штамм *Rhodococcus* sp. Rh7bel имел наиболее высокое значение утилизации ДБФ (70.7% за 72 ч., при начальной концентрации субстрата 0.2 г/л) и максимальную удельную скорость потребления ДБФ ($0.018 \pm 0.002 \text{ ч}^{-1}$). Таким образом, ризосферные штаммы-деструкторы ДБФ *Rhodococcus* sp. Rh7bel, *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFbel и NKDBFgelt являются перспективными для дальнейшего изучения и разработки технологии фиторемедиации почв, загрязненных фталатами.

Список источников

1. Бачурин Б.А., Одинцова Т.А. Стойкие органические загрязнители в отходах горного производства // Современные экологические проблемы Севера. Апатиты: Изд-во Кольского НЦ РАН. 2006. Ч. 2. С. 7–9.
2. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир, 1983. Т. 1–3.
3. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.
4. Chen F. et al. High-efficiency degradation of phthalic acid esters (PAEs) by *Pseudarthrobacter defluvii* E5: performance, degradative pathway, and key genes // Sci. Total Environ. 2021. Vol. 794. 148719.
5. Choi K.Y. et al. Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17 // FEMS Microbiol. Letters. 2005. Vol. 252. P. 207–213.
6. Eaton R.W. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B // J. Bacteriol. 2001. Vol. 183. P. 3689–3703.
7. Jin D.-C. et al. Biodegradation of di-n-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. JDC-11 and molecular detection of 3,4-phthalate dioxygenase gene // J. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 20(10). P. 1440–1445.

8. Kanaujiya D.K., Sivashanmugam S., Pakshirajan K. Biodegradation and toxicity removal of phthalate mixture by *Gordonia* sp. in a continuous stirred tank bioreactor system // *Environmental Technology & Innovation*. 2022. Vol. 26. 102324.
9. Kasai D. et al. 2,3-dihydroxybenzoate meta-cleavage pathway is involved in *o*-phthalate utilization in *Pseudomonas* sp. strain PTH10 // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9. 1253.
10. Li Y.W. et al. Plant uptake and enhanced dissipation of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in spiked soils by different plant species // *International Journal of Phytoremediation*. 2014. Vol. 16. P. 609–620.
11. Liang D.-W. et al. Phthalates biodegradation in the environment // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. Vol. 80. P. 183–198.
12. Liao C.S., Nishikawa Y., Shih Y.T. Characterization of di-n-butyl phthalate phytoremediation by garden lettuce (*Lactuca sativa* L. var. longifolia) through kinetics and proteome analysis // *Sustainability*. 2019. Vol. 11. P. 1–16.
13. Randika J.L.P.C. et al. Bioremediation of pesticidecontaminated soil: a review on indispensable role of soil bacteria // *The Journal of Agricultural Sciences – Sri Lanka*. 2022. Vol. 17(1). P. 19–43.
14. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Develop. Ind. Microbiol.* 1961. Vol. 2(1). P. 23–32.
15. Stanislauskiene R. et al. Analysis of phthalate degradation operon from *Arthrobacter* sp. 68b // *Biologija*. 2011. Vol. 57(3). P. 45–54.
16. Vamsee-Krishna C., Phale P.S. Bacterial degradation of phthalate isomers and their esters // *Indian J. Microbiol.* 2008. Vol. 48. P. 19–34.
17. Wenzel W.W. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils // *Plant & Soil*. 2009. Vol. 321. P. 385–408.
18. Wu K. et al. Responses of soil microbial community and enzymes during plant-assisted biodegradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate and pyrene // *International Journal of Phytoremediation*. 2019. Vol. 21(7). P. 683–692.
19. Zhang Y. et al. Effect of di-n-butyl phthalate on root physiology and rhizosphere microbial community of cucumber seedlings // *Journal of Hazardous Materials*. 2015. Vol. 289. P. 9–17.

References

1. Bachurin B.A., Odincova T.A. [Persistent organic pollutants in mining waste]. *Sovremennye ekologičeskie problemy Severa* [Modern environmental problems of the North]. Apatity, 2006, P. 2, pp. 7-9. (In Russ.).
2. Gerhardt F., ed. *Metody obščej bakteriologii* [Methods of general bacteriology]. Moscow, Mir Publ., 1983. V. 1-3. (In Russ.).
3. Netrusov A.I. *Praktikum po mikrobiologii* [Practicum on microbiology]. Moscow, Akademija Publ., 2005. 608 p. (In Russ.).
4. Chen F. et al. High-efficiency degradation of phthalic acid esters (PAEs) by *Pseudarthrobacter defluvii* E5: performance, degradative pathway, and key genes. *Sci. Total Environ.* V. 794 (2021). 148719.
5. Choi K.Y. et al. Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *FEMS Microbiol. Letters*. V. 252 (2005): pp. 207-213.
6. Eaton R.W. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. *J. Bacteriol.* V. 183 (2001): pp. 3689-3703.
7. Jin D.-C. et al. Biodegradation of di-n-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. JDC-11 and molecular detection of 3,4-phthalate dioxygenase gene. *J. Microbiol. Biotechnol.* V. 20(10) (2010): pp. 1440-1445.
8. Kanaujiya D.K., Sivashanmugam S., Pakshirajan K. Biodegradation and toxicity removal of phthalate mixture by *Gordonia* sp. in a continuous stirred tank bioreactor system. *Environmental Technology & Innovation*. V. 26 (2022). 102324.
9. Kasai D. et al. 2,3-dihydroxybenzoate meta-cleavage pathway is involved in *o*-phthalate utilization in *Pseudomonas* sp. strain PTH10. *Scientific Reports*. V. 9 (2019). 1253.
10. Li Y.W. et al. Plant uptake and enhanced dissipation of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in spiked soils by different plant species. *International Journal of Phytoremediation*. V. 16 (2014): pp. 609-620.
11. Liang D.-W. et al. Phthalates biodegradation in the environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 80 (2008): pp. 183-198.
12. Liao C.S., Nishikawa Y., Shih Y.T. Characterization of di-n-butyl phthalate phytoremediation by garden lettuce (*Lactuca sativa* L. var. longifolia) through kinetics and proteome analysis. *Sustainability*. V. 11 (2019): pp. 1-16.
13. Randika J.L.P.C. et al. Bioremediation of pesticidecontaminated soil: a review on indispensable role of soil bacteria. *The Journal of Agricultural Sciences – Sri Lanka*. V. 17(1) (2022): pp. 19-43.
14. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. *Develop. Ind. Microbiol.* V. 2(1) (1961): pp. 23-32.

15. Stanislauskiene R. et al. Analysis of phthalate degradation operon from *Arthrobacter* sp. 68b. *Biologija*. V. 57(3) (2011): pp. 45-54.
16. Vamsee-Krishna C., Phale P.S. Bacterial degradation of phthalate isomers and their esters. *Indian J. Microbiol.* V. 48 (2008): pp. 19-34.
17. Wenzel W.W. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant & Soil*. Vol. 321 (2009): pp. 385-408.
18. Wu K. et al. Responses of soil microbial community and enzymes during plant-assisted biodegradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate and pyrene. *International Journal of Phytoremediation*. V. 21(7) (2019): pp. 683-692.
19. Zhang Y. et al. Effect of di-n-butyl phthalate on root physiology and rhizosphere microbial community of cucumber seedlings. *Journal of Hazardous Materials*. V. 289 (2015): pp. 9-17.

Статья поступила в редакцию 25.10.2023; одобрена после рецензирования 10.11.2023; принята к публикации 20.11.2023.

The article was submitted 25.10.2023; approved after reviewing 10.11.2023; accepted for publication 20.11.2023.

Информация об авторах

Е. С. Корсакова – канд. биол. наук, научный сотрудник, доцент кафедры ботаники и генетики растений;
А. А. Пьянкова – младший научный сотрудник;
Е. Г. Плотникова – д-р биол. наук, доцент, зав. лабораторией, профессор кафедры ботаники и генетики растений.

Information about the authors

E. S. Korsakova – candidate of biological sciences, researcher, associate professor of the Department of Botany and Plant Genetics;
A. A. Pyankova – junior researcher;
E. G. Plotnikova – doctor of biological sciences, associate professor, head of laboratory, professor of the Department of Botany and Plant Genetics.

Вклад авторов:

Корсакова Е. С. – экспериментальная работа; статистическая обработка материала; написание исходного текста.
Пьянкова А. А. – экспериментальная работа; статистическая обработка материала; доработка текста.
Плотникова Е. Г. – научное руководство, концепция исследования, доработка текста.

Contribution of the authors:

Korsakova E. S. – experimental work; statistical processing of material; writing the source text.
Pyankova A. A. – experimental work; statistical processing of material; text revision.
Plotnikova E. G. – scientific guidance, research concept, text revision.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

МИКРОБИОЛОГИЯ

Обзорная статья

УДК 579.61

doi: 10.17072/1994-9952-2023-4-356-366

Алармоны как фактор персистенции бактерий

Роман Юрьевич Сидоров^{1,3}, Александр Георгиевич Ткаченко^{2, 4}

^{1,2} Институт экологии и генетики микроорганизмов, ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

^{3,4} Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

^{1,3} sidorov.r@iegm.ru

^{2,4} agtkachenko@iegm.ru

Аннотация. Лечение бактериальных инфекций антибиотиками существенно осложняется вследствие адаптивных механизмов, которые используют бактерии. Хронические и рецидивирующие инфекции часто связаны с такими процессами, как бактериальная персистенция, образование биопленок и толерантность к антибиотикам. Эти явления приводят к снижению метаболической активности, что делает бактерии нечувствительными к обычным антибиотикам, которые преимущественно оказывают воздействие на активно растущие клетки. Стринджен-ответ, регулируемый алармонами (p)ppGpp, является механизмом адаптации к стрессу, консервативным для многих бактериальных видов, и играет ключевую роль в обеспечении долговременного выживания при дефиците питательных веществ. Алармоны (p)ppGpp также имеют важное значение в формировании бактериальной персистенции и биопленок. Поиск новых антибактериальных препаратов, специфически нацеленных на подавление синтеза (p)ppGpp, и, таким образом, ингибирующих стринджен-ответ, представляет собой многообещающую стратегию в борьбе с бактериальными инфекциями. В этом контексте ингибиторы алармонсинтеза являются перспективными кандидатами для клинического применения, поскольку они демонстрируют эффективность в подавлении механизмов выживания бактерий, уменьшают образование биопленок и снижают толерантность к антибиотикам и персистенцию бактерий.

Ключевые слова: персистенция бактерий, резистентность к антибиотикам, алармоны, (p)ppGpp, дормантность, RSH, ингибиторы алармонсинтеза

Для цитирования: Сидоров Р. Ю., Ткаченко А. Г. Алармоны как фактор персистенции бактерий // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 4. С. 356–366. (на англ.) <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-356-366>.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № АААА-А19-119112290009-1.

MICROBIOLOGY

Review article

Alarmones as bacterial persistence factor

Roman Yu. Sidorov^{1,3}, Alexander G. Tkachenko^{2, 4}

^{1,2} Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, PFRC, the Ural Branch of RAS, Perm, Russia

^{3,4} Perm State University, Perm, Russia

^{1,3} sidorov.r@iegm.ru

^{2,4} agtkachenko@iegm.ru

Abstract. The treatment of bacterial infections with antibiotics is significantly complicated because of the adaptive mechanisms employed by bacteria. Chronic and recurrent infections are often linked to bacterial persistence, biofilm formation, and antibiotic tolerance. These processes result in reduced metabolic activity, rendering bacteria insensitive to conventional antibiotics that primarily target actively growing cells. The stringent response, regulated by (p)ppGpp alarmone molecules, serves as a stress adaptation mechanism. It is conserved across numerous bacterial species and plays an important role in long-term survival under nutrient-depleted conditions. (p)ppGpp alarmones also play a significant role in bacterial persistence and the formation of biofilms. The pursuit of novel antibacterial agents that specifically target (p)ppGpp synthesis, thereby inhibiting the stringent response, presents a promising strategy in the battle against bacterial infections. In this context, alarmone synthetase inhibitors emerge as promising candidates for clinical application, as they have demonstrated their

effectiveness in suppressing bacterial survival mechanisms, inhibiting biofilm formation, and reducing antibiotic tolerance and bacterial persistence.

Keywords: bacterial persistence, antimicrobial resistance, alarmones, (p)ppGpp, dormancy, RSH, alarmones synthetase inhibitors

For citation: Sidorov R. Yu., Tkachenko A. G. Alarmones as bacterial persistence factor. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 4 (2023): pp. 356-366. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-356-366>.

Acknowledgments: the work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Project №AAAA-A19-119112290009-1.

Introduction

Significant challenges in bacterial infection treatment emerge due to mechanisms of bacterial adaptation to antibiotics, encompassing inherited resistance and non-inherited persistence [Brauner et al., 2017; Ehrt et al., 2018]. Antimicrobial resistance results in ineffective antibiotic treatment, while bacterial persistence extends the treatment duration and elevates the risk of infection relapse. Bacterial persistence stands as a major obstacle in managing numerous chronic bacterial infections, including tuberculosis, recurrent urinary tract infections, typhoid fever, staphylococcal infections, and various other bacterial diseases [Salcedo-Sora & Kell, 2020]. The relevance of persistence in infection relapse can be exemplified by tuberculosis. In active tuberculosis, mycobacteria multiply within the patient's body, leading to the manifestation of disease symptoms and facilitating the transmission of the infection. However, tuberculosis can persist in a latent state, when the bacteria survive within the host's lungs without triggering noticeable symptoms [Gong & Wu, 2021]. Treatment for tuberculosis aims at elimination of the actively growing bacterial population in the course of antimicrobial therapy. However, a subsequent prolonged treatment is often necessary to eradicate latent TB infection and prevent relapse [Mandal et al., 2019]. Clinically used antibiotics prove relatively effective against non-resistant strain during the initial treatment phase, suppressing bacterial growth and managing disease symptoms [Huaman & Sterling, 2019]. However, in the subsequent continuation phase, conventional antibiotics frequently prove ineffective against dormant persister cells, leading to a high incidence of recurrent infections [Mandal et al., 2019].

Bacterial persistence

Bacterial persistence is a phenomenon characterized by bacterial cells displaying reduced sensitivity to antibiotics forming a distinct subpopulation known as "persisters" within a bacterial population. Despite being genetically identical to the regular cells, persisters possess the ability to endure antibiotic exposure by entering a dormant state. Subsequently, they can reactivate their growth when conditions become favorable [Brauner et al., 2016].

In contrast to bacterial cells that acquired antimicrobial resistance, persister cells do not rely on specialized resistance genes or mutations to protect themselves from certain antibiotics. They emerge due to phenotypic plasticity, including alterations in protein composition, enzymatic activities, transcriptomic profiles, second messenger concentrations, DNA topology, and metabolic shifts [Balaban et al., 2004; Davis & Isberg, 2016]. A defining characteristic of persister cells is their capacity to decelerate metabolic processes, providing protection against antibiotic-induced damage [Wood et al., 2013]. Unlike genetically determined resistance, the persister cell phenotype is not hereditary in subsequent generations. Consequently, following the end of antibiotic exposure, persister cells can reactivate their metabolism, regain the ability to grow and divide, while preserving their original genotype [Maisonneuve & Gerdes, 2014].

Even when environmental conditions are optimal for bacterial growth, a presence of slow-growing and non-dividing cells within the bacterial population is observed [Grimbergen et al., 2015]. This adaptation can be interpreted as a bet-hedging strategy. The majority of the population directs its efforts towards maximizing resource utilization and rapid expansion, while a smaller fraction of persister cells acts as a form of insurance, preparing for potential future challenges or stressors [Kaldalu et al., 2016].

Based on the existing data, persistence appears to be a prevalent trait among all studied bacterial species to varying degrees. A comprehensive analysis of experimental articles on bacterial persistence published up to 2020, encompassing 54 distinct antibiotics and 36 bacterial species, failed to identify any bacterial species incapable of forming persister cells [Salcedo-Sora & Kell, 2020]. This significant finding underscores the notion that, while resistance is confined to specific strains, persistence is a pervasive feature found in all bacterial species investigated.

The efficacy of conventional antibiotics is contingent not only upon their direct interaction with cellular targets but also on the ensuing cascade of metabolic disturbances [Stokes et al., 2019]. For instance, antibiotics such as ampicillin, kanamycin, and norfloxacin, despite targeting different bacterial cell components, trigger a common phenomenon—the generation of hydroxyl radicals. These radicals can inflict damage upon macromolecules and, consequently, lead to bacterial cell death, a phenomenon not observed with bacteriostatic antibiotics

[Kohanski et al., 2007]. Therefore, mitigating the activity of an antibiotic target in persister cells may prove crucial in preventing the accumulation of toxic metabolites.

Indeed, numerous bactericidal antibiotics display a substantial reliance on the metabolic status of bacteria, as evidenced by studies [Zheng et al., 2020]. This reliance of antibiotic effectiveness on the metabolic rate has been well-documented across various antibiotic classes, including β -lactams, quinolones, and aminoglycosides. This can be exemplified in slow-growing bacterial strains, characterized by an enhanced ability to survive and tolerate antibiotics. This phenomenon is also noticeable in persister cells, which exhibit a slow metabolism, rendering them less susceptible to the impact of bactericidal antibiotics [Kester & Fortune, 2014]. Given that most antibiotics target actively functioning cellular components in actively growing cells, persister cells remain insensitive to their effects.

The minimum inhibitory concentration (MIC) test typically utilized to determine antimicrobial resistance is not suitable for assessing persistence, because persister cells do not proliferate in the presence of the antibiotic but are able to survive in a dormant state [Brauner et al., 2018]. To analyze persistence, as well as tolerance, killing curves (time-kill curves) in the presence of an antibiotic are used (Fig. 1). An antibiotic is added to the bacterial culture in a concentration exceeding the MIC, and the number of surviving cells in the culture is measured depending on the time of incubation with the antibiotic. In the case of non-resistant cells, a two-phase curve is observed. The first phase reflects the intensive killing of the general population of actively growing cells, and the second phase is characterized by the slow killing of a small fraction of persisters [Lewis, 2010].

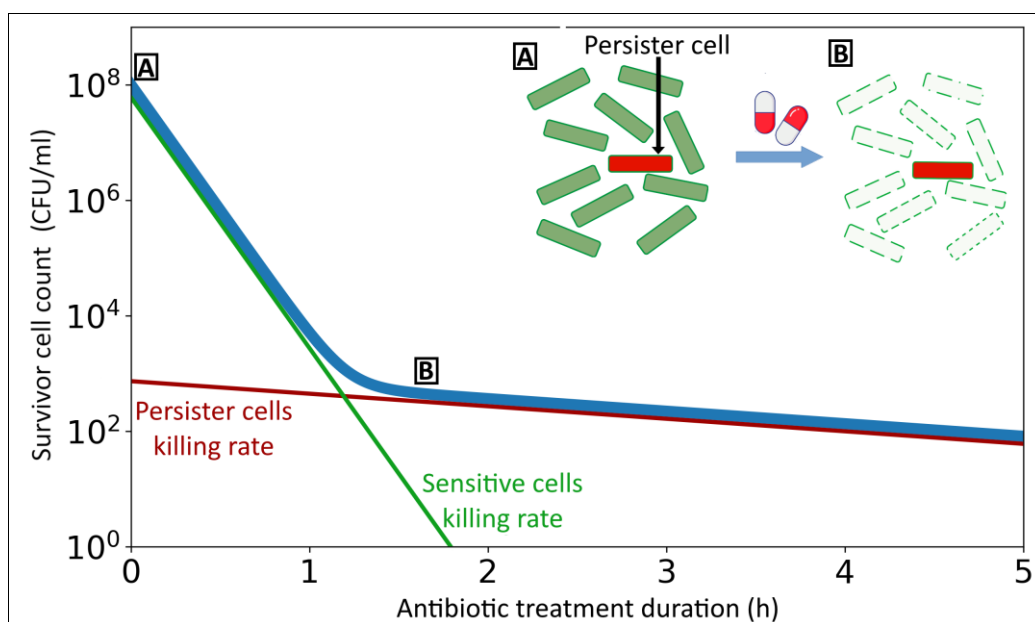


Fig. 1. The typical killing curve of a non-resistant strain culture exposed to a bactericidal antibiotic: Upon the addition of the antibiotic (A), the majority of cells within the culture will rapidly perish upon exposure (B). These are the sensitive, actively growing cells within the population. Approximately 10^3 cells per ml exhibit a significantly slower killing rate (B). These surviving cells constitute a population of persisters, which, in this case, is approximately 100,000 times smaller than the entire population (10^8 CFU per ml). The curve is generated using the Matplotlib Python package and is based on the equation 1 [Klapper & Dockery, 2010].

$$f(t) = 10^8 * e^{-10t} + 10^3 * e^{-0.5t} \quad (1)$$

In some bacterial species, the eradication of persister cells within a population can be achieved by repeated culture reinoculation during the early exponential phase, thereby preventing the culture from transitioning into the stationary or lag phase. This phenomenon has been demonstrated in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* [Keren et al., 2004]. However, it is only partially characteristic of other bacterial species, such as *Mycobacterium smegmatis* [Bhaskar et al., 2018]. This observation underscores the important role of stationary or lag phase stresses in the development of a persister metabolic state. Numerous studies have demonstrated the inducing influence of various stressors on the emergence of persister cells. This effect is noticeable in response to oxidative stress [Wu et al., 2012], acid stress [Hong et al., 2012], or change of carbon source [Amato et al., 2013; Amato & Brynildsen, 2015; Mok et al., 2015].

Both resistance and persistence represent distinct strategies employed by bacteria to counteract antibiotics and are not concurrently active within the same bacterial strain. Nevertheless, over the course of the species' evolution, these strategies can complement each other [Vogwill et al., 2016]. Persister cells undergo evolutionary

pressure from antibiotics but manage to survive their effects. As a result, with each new generation, random mutations accumulate in these surviving cells, some of which may confer resistance to the antibiotic. Persistence facilitates the natural selection of such mutations under the direct influence of environmental factors, such as antibiotics, occasionally resulting in the conversion of persistence into resistance [Sebastian et al., 2017]. Therefore, bacteria that are frequently exposed to antibiotics and manage to survive through persistence are at a higher risk of accumulating mutations that provide antimicrobial resistance [Cohen et al., 2013; Mandal et al., 2019].

Persister formation factors

The emergence of persister cells is closely linked to the growth phase of a batch culture. The largest proportion of persister cells forms during the stationary phase, attributable to slower growth rates [Brauner et al., 2016; Salcedo-Sora & Kell, 2020]. Furthermore, persister cells are generated during the lag phase, when growth halts as the bacteria adapt to environmental conditions [Brauner et al., 2016]. Additionally, they are formed at a lower frequency during the exponential phase, partly due to genetic noise and population heterogeneity [Zhang, 2014; Amato & Brynildsen, 2015].

Biofilms also play a significant role in the development of persistence. The biofilm matrix restricts the nutrient availability into the innermost and mature regions of the biofilm [Yan & Bassler, 2020]. This limitation results in localized nutrient depletion, requiring adaptation to starvation conditions. Stress response renders the cellular targets of antibiotics inactive, making cells insensitive to antibiotics effects. This represents one of the mechanisms that induces the emergence of persister cells within biofilms [Nguyen et al., 2011]. Consequently, persister cells are integral components of biofilms and contribute to their enhanced ability to survive exposure to antibiotics.

Identifying the genes responsible for the development of persistence is a challenging endeavor that demands a non-trivial approach. A method that has been successful in pinpointing genes linked to fundamental bacterial functions, such as flagella formation, chemotaxis, virulence, which involves screening libraries of single knockouts, has proven unyielding in discovering a single-knockout mutant that fails to generate persister cells [Lewis, 2010]. Nonetheless, in strains with knockouts of certain global transcriptional regulators that influence the expression of numerous genes, a tenfold reduction in the persistence frequency has been observed. These findings point to the cumulative nature of persister cell formation. It appears that persisters are generated through the concerted action of multiple independent and parallel mechanisms, aligning with their adaptive characteristics. An important implication of the polygenic basis for persister cell formation is the impossibility of entirely suppressing it with a single pharmacological compound [Lewis, 2010].

Analogous to the term "resistome," which refers to a set of resistance genes, we can introduce the concept of a "persistome" for genes involved in the formation of persistence. The persistome encompasses a diverse array of genes [Keren et al., 2004; Prax & Bertram, 2014]. However, the genes most frequently discussed in the literature concerning persistence are those related to toxin-antitoxin modules [Zamakhaev et al., 2019] and (p)ppGpp alarmone synthesis [Harms et al., 2016].

Dormancy

Bacterial dormancy denotes a state in which bacterial cells cease metabolic activity and reproduction for an extended period while remaining viable [Wood et al., 2013]. Dormancy can be regarded as a more pronounced form of growth cessation [Brauner et al., 2016]. Different levels of dormancy depth are discerned based on the duration of the lag phase required for growth resumption [Pu et al., 2019]. The utmost level of dormancy depth is evident in viable but nonculturable bacterial cells (VBNC) [Pu et al., 2019].

Combining fluorescence microscopy and microfluidics techniques, researchers found that cells of a hyperpersistent *hipA7* mutant strain that survived ampicillin action showed no growth before the exposure to the antibiotic [Balaban et al., 2004]. Another study showed that pretreatment with the transcription inhibitor rifampicin or the translation inhibitor tetracycline resulted in increased survival when exposed to the ampicillin and ciprofloxacin antibiotics, linking reduced protein synthesis to persistence [Kwan et al., 2013]. The important role of ATP synthesis as a marker of persistence was demonstrated in a study where cells were exposed to arsenate, which disrupts glycolysis and thus reduces ATP production. Cells with low levels of ATP, characteristic of the stationary phase, had a level of persistence to ciprofloxacin and ampicillin to the same extent as stationary-phase cells [Shan et al., 2017]. In addition, a decrease in intracellular ATP concentration serves as a regulator of the formation of insoluble protein aggregates called aggregates, which contribute to the formation of dormancy and ultimately persistence [Pu et al., 2019]. The mentioned experimental data clearly indicate the dormant nature of the persistence phenomenon.

However, the existing body of evidence challenging a robust connection between persistence and dormancy is limited. For instance, utilizing fluorescence-activated flow cytometry, researchers discovered that low metabolic activity does not necessarily presume persistence, as more than 99% of dormant cells did not exhibit per-

sister characteristics [Orman & Brynildsen, 2013]. Furthermore, this study revealed that around 20% of persister cells were in a state of active growth. These findings, however, have faced criticism related to the inherent biases of the method and the criteria used to define the growing state [Wood et al., 2013]. Subsequently, the same research group employed an improved version of the same method, revealing that ofloxacin persisters exhibited reduced levels of protein synthesis [Henry & Brynildsen, 2018].

Activation of the *marRAB* operon results in the development of antibiotic insensitivity without impeding growth. Moreover, heightened expression of efflux pumps can decrease the antibiotic burden within a cell through active expulsion. These mechanisms can be instigated by genetic alterations, constituting a manifestation of resistance. Nevertheless, the overexpression of these genes can also stem from random fluctuations or stress, a characteristic of persistence. To delineate these occurrences, the concept of *heteroresistance* is employed, where only a fraction of the population demonstrates resistant traits [Brauner et al., 2016].

Drawing from the preceding discussion, it becomes evident that dormancy is indeed a distinctive feature of persister cells. However, it's important to note that while dormancy is associated with persistence, the two notions are not entirely synonymous. If a cell is incapable of emerging from a state of profound dormancy, it would not be considered part of the persister population that withstands the antibiotic's effects [Pu et al., 2019].

(p)ppGpp alarmones

A study examining the *hipA7* allele, which is associated with a higher persister frequency, found that when the *relA* and *spoT* genes are deleted, the *hip* mutant of *E. coli* no longer exhibits an increased production of persister cells [Korch et al., 2003]. In *E. coli*, the *relA* and *spoT* genes encode (p)ppGpp synthetase proteins responsible for converting guanosine nucleotides into nucleotide messengers known as (p)ppGpp or alarmones [Beljantseva et al., 2017]. The term "alarmones" is derived from a fusion of the words "alarm" and "hormone," reflecting the fact that these regulatory molecules are synthesized within bacterial cells in response to unfavorable environmental conditions, effectively functioning as molecular alarm signals.

Stress factors can disrupt the optimal rate of the translation elongation process. To address this challenge, cells activate a mechanism known as the stringent response. The classic stringent response in bacteria is triggered when there is a shortage of amino acids. Protein synthesis necessitates a supply of all 20 amino acids. Insufficient levels of even one amino acid within the cell can result in the production of incomplete and nonfunctional proteins. In such instances, the cell initiates the stringent response, which, in the *E. coli*, is orchestrated by the enzyme RelA, capable of synthesizing (p)ppGpp [Starosta et al., 2014]. When any amino acid becomes scarce, the corresponding uncharged tRNA starts to accumulate within the cell. RelA forms a complex by initially binding to the uncharged tRNA and subsequently to the ribosome. This formation of the RelA-tRNA-ribosome complex activates the alarmone synthetase RelA, ultimately leading to an accumulation of (p)ppGpp within the *E. coli* cell [Winther et al., 2018]. Alarmones are able to bind RNA polymerase, modulating its selectivity for gene promoters [Mechold et al., 2013]. They suppress the ability of RNA polymerase to interact with GC-rich discriminatory regions of promoters, characteristic of ribosomal RNA and protein genes, which reduces their transcription level, and therefore the rate of protein synthesis [Wagner, 2002; Burgos et al., 2017].

Guanosine nucleotides, namely GTP, GDP, and GMP (guanosine triphosphate, guanosine diphosphate, and guanosine monophosphate), serve crucial roles in intracellular energy and information processes. GTP is utilized by RNA polymerase for RNA strand synthesis. In RNA, the linkage between adjacent nucleotides forms between the 5'-phosphate and the 3'-OH group [Murakami, 2015]. However, as part of the stringent response, guanosine nucleotides are transformed into regulatory molecules known as alarmones. This conversion is catalyzed by (p)ppGpp synthetases, capable of transferring pyrophosphate from ATP to the 3'-OH group of GTP, GDP, or GMP, resulting in the synthesis of guanosine pentaphosphate (pppGpp), guanosine tetraphosphate (ppGpp), and guanosine 5'-mono-3'-diphosphate (pGpp) (Fig. 2) [Syal et al., 2021]. The alarmones pppGpp and ppGpp are typically collectively referred to as (p)ppGpp. However, if pGpp is included, all three alarmones are denoted as (pp)pGpp. Alarmones represent just one instance of regulatory molecules generated from available metabolites within the organism [Irving et al., 2021].

Since the (p)ppGpp molecule was first discovered in 1969 through autoradiography by Cashel and Gallant [Cashel & Gallant, 1969], the comprehension of its cellular functions has significantly broadened beyond the stringent response. In *E. coli*, the accumulation of (p)ppGpp has far-reaching effects, influencing the expression of approximately 500 genes by stabilizing RpoS, a sigma factor for stationary phase genes [Merrikh et al., 2009]. Moreover, in *E. coli* cells, (p)ppGpp directly inhibits DNA primase [Maciag et al., 2010; Giramma et al., 2021], thereby restricting DNA replication, suppresses rRNA synthesis, and modulates the transcription of the ribosome modulation factor Rmf, affecting translation [Izutsu et al., 2001]. Collectively, these changes result in a slowdown of cell growth [Pacios et al., 2020]. The set of identified targets affected by (p)ppGpp continues to expand [Kushwaha et al., 2020]. For instance, the interaction of (p)ppGpp with the translation initiation factor IF2 halts protein synthesis [Diez et al., 2020], the suppression of GTPase activity by (p)ppGpp leads to a reduction in the

number of mature ribosomes [Corrigan et al., 2016], and (p)ppGpp interaction with HPRT inhibits purine metabolism [Anderson et al., 2019].

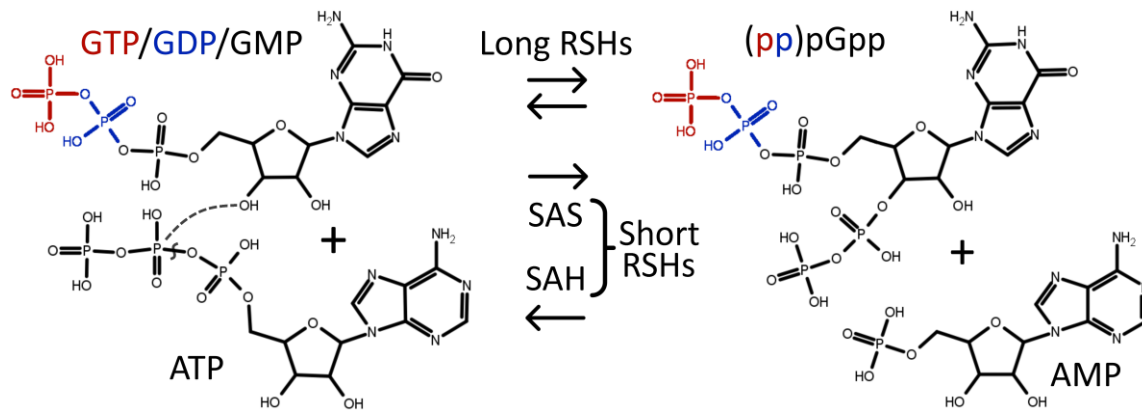


Fig. 2. Alarmones synthesis and hydrolysis:

In the (pp)pGpp synthesis process, pyrophosphate is transferred from ATP to the 3'-OH group of GTP/GDP/GMP, leading to the production of AMP. During hydrolysis, the 3'-pyrophosphate in (pp)pGpp is cleaved, resulting in the restoration of GTP/GDP/GMP. These reactions are catalyzed by enzymes belonging to the RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily. Long RSHs are generally capable of both (p)ppGpp synthesis and hydrolysis, while short RSHs are specialized for either synthesis (small alarmones synthetases, or SAS) or hydrolysis (small alarmones hydrolases, or SAH).

Furthermore, research has demonstrated an association between elevated levels of (p)ppGpp and the development of tolerant and persistent cells [Rodionov & Ishiguro, 1995; Hobbs & Boraston, 2019]. *P. aeruginosa* mutants deficient in the *spoT* and *dksA* genes, which exhibit heightened (p)ppGpp levels, display the suppression of negative DNA supercoiling. This suppression restricts DNA replication and transcription, ultimately conferring tolerance to ofloxacin and ciprofloxacin [Viducic et al., 2006]. Alarmones enhance antibiotic tolerance in *Vibrio cholerae* by diminishing the production of reactive oxygen species in response to antibiotic exposure [Kim et al., 2018]. Furthermore, the role of (p)ppGpp in the emergence of resistance to penicillin and vancomycin antibiotics has been elucidated [Wu et al., 2010].

Bacteria residing in the deeper layers of biofilms confront restricted nutrient availability, prompting the activation of the stringent response. It has been established that the persistence of *P. aeruginosa* and *E. coli* cultivated within biofilms is contingent on (p)ppGpp. In the $\Delta relA \Delta spoT$ mutant of *P. aeruginosa*, which exhibits impaired (p)ppGpp production, the protective capacity of biofilms against antibacterial agents diminishes [Nguyen et al., 2011]. The influence of (p)ppGpp on biofilm formation has also been documented in *Pseudomonas putida* [Liu et al., 2017], *Helicobacter pylori* [Zhao et al., 2021], *M. smegmatis* [Gupta et al., 2015], and *Mycobacterium tuberculosis* [Gupta et al., 2021].

The alarmones (p)ppGpp plays a crucial role in growth rate control in *E. coli* [Potrykus et al., 2011]. Growth rate control ensures that the ratios of total RNA to DNA and total RNA to protein within a cell increase as the number of cell divisions per hour rises. The (p)ppGpp-deficient strain lacks the ability to regulate growth rate entering the stationary phase without achieving metabolic equilibrium [Potrykus et al., 2011; Fernández-Coll et al., 2020]. Given that a decreased level of (p)ppGpp hampers cellular adaptation to the stationary phase, blocking the stringent response systems can prevent the development of the persister cell phenotype, which is characteristic of this growth phase.

Nonetheless, even in the (p)ppGpp-deficient background, bacterial cells can still generate persisters, albeit in reduced quantities. Studies have revealed that augmented production of toxins such as MqsR, MazF, GhoT, and YafQ in *E. coli* $\Delta relA \Delta spoT$ cells still results in increased persistence. Therefore, (p)ppGpp is not an absolute prerequisite for the formation of persisters. However, when these toxins are expressed in the presence of (p)ppGpp, a statistically significant increase in the number of persisters is observed [Chowdhury et al., 2016].

The stringent response is a mechanism of adaptation to stress, conserved among different bacterial species, and is involved in long-term survival during nutrient starvation, biofilm formation, virulence, antibiotic tolerance and persistence in *M. tuberculosis* [Warner & Mizrahi, 2006; Gupta et al., 2021]. When the *relMtb* gene, responsible for the synthesis of (p)ppGpp, is deleted from *M. tuberculosis*, the bacterium loses the ability for long-term survival in stress conditions and is no longer able to induce latent tuberculosis in a mouse model infected with this particular bacterial strain [Weiss & Stallings, 2013]. (p)ppGpp deficiency in *M. tuberculosis* leads to impaired long-term survival during nutrient starvation or hypoxia [Primm et al., 2000], as well as decreased persistence during the chronic phase of infection in the lungs of mice [Dahl et al., 2003]. This strain also loses the ability to adapt the division rate to the composition of the culture medium. The replication rate in carbon-depleted medium becomes the same as in the nutrient rich medium, which leads to the death of bacteria, in contrast to the

wild-type strain with an adaptive division rate. Additionally, this strain loses its capacity to regulate intracellular ATP concentration and to suppress lipid metabolism during nutrient starvation, resulting in reduced viability [Dutta et al., 2019]. The deletion of *rel_{Mtb}* in *M. tuberculosis* cells leads to the absence of extensive tuberculous lesions and histological signs of granulomas in the lungs of guinea pigs infected with this strain [Klinkenberg et al., 2010]. Under starvation conditions, the minimum bactericidal concentration of isoniazid, which is the concentration needed to eliminate 99% of *M. tuberculosis* cells in culture, increases 512-fold. However, in the strain with a *rel_{Mtb}* deletion, no such increase is observed [Dutta et al., 2019]. These findings indicate that the full functioning of the stringent response is essential to ensure *M. tuberculosis* tolerance to bactericidal antibiotics when subjected to stress in vitro and within animal tissues and underscore the potential clinical significance of (p)ppGpp in the management of bacterial infections.

Alarmone synthetase inhibitors

The development of novel drugs plays an important role in the battle against tuberculosis. Over the last decade, novel anti-tuberculosis drugs, such as bedaquiline and delamanid, have been introduced. These drugs feature novel mechanisms of action aimed at addressing multidrug resistance [Li et al., 2019]. While novel mechanisms can address resistance, they represent a temporary solution unless measures are taken to shorten treatment duration and control latent tuberculosis in its advanced stages. Antibacterial agents targeting persistent and tolerant cells, along with biofilms, hold promise as potential solutions to these challenges. The stringent response inhibition emerges as a promising strategy for the treatment of tuberculosis infection [Danchik et al., 2021].

A novel class of antibacterial compounds that inhibit the (p)ppGpp synthesis in bacteria holds the potential to address late phases of infection and tackle the issue of persistence [Kushwaha et al., 2019]. Compounds that inhibit (p)ppGpp synthesis demonstrate limited activity against actively growing bacterial cells but can efficiently target late bacterial cultures, where the proportion of slowly growing and dormant cells increases [Dutta et al., 2019]. This feature presents a potential remedy for the issue posed by conventional antibiotics, which, despite their effectiveness against actively growing cells, have limited influence on non-growing cells.

The class of alarmone synthetase inhibitors comprises structurally diverse compounds, including relacin and its analogs, vitamin C, GSK-X9, and DMNP [Sinha et al., 2023]. Relacin effectively inhibited the sporulation of *Bacillus anthracis*, the causative agent of anthrax, and impeded biofilm formation in *Bacillus subtilis* [Wexselblatt et al., 2012]. Relacin analogs AC and AB disrupted long-term cell survival in *M. smegmatis* cultures under nutrient-starved conditions. These compounds suppressed biofilm formation in both *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* and also disrupted pre-existing biofilms [Syal et al., 2017]. The X9 inhibitor effectively mitigated tolerance to isoniazid induced by nutrient starvation [Dutta et al., 2019]. Exposure to X9 replicated the survival deficiencies observed in the *M. tuberculosis* strain with the *rel_{Mtb}* gene deletion. Furthermore, DMNP demonstrated activity against *M. smegmatis* stationary phase cells and possessed the capability to interfere with biofilm formation in this bacterium [Tkachenko et al., 2021]. The ability of these compounds to suppress biofilm formation, impair long-term survival in nutrient-starved conditions, and reduce tolerance and persistence indicates the clinical potential of alarmone synthetase inhibitors for the treatment of bacterial infections.

Conclusion

Bacterial persistence serves as an important bacterial strategy to reduce susceptibility to antibiotics. In contrast to antimicrobial resistance, persister cells cannot actively grow in the presence of antibiotics; instead, they transition into a slowly growing or completely dormant state. This shift can be advantageous because conventional antibiotics primarily target metabolic processes in actively growing cells, leaving persisters capable of surviving antibiotic exposure. Research has unveiled a link between heightened (p)ppGpp levels and the emergence of tolerant and persistent bacterial cells. The stringent response, a stress adaptation mechanism, which is conserved in many bacterial species, is instrumental in long-term survival under nutrient-depleted conditions and contributes to processes such as biofilm formation, virulence, antibiotic tolerance, and persistence. The pursuit of novel antibacterial agents that specifically target (p)ppGpp synthesis, thus inhibiting the stringent response, represents a promising approach to combat bacterial infections. Alarmone synthetase inhibitors show great potential for clinical application in this context, as they have demonstrated their effectiveness in suppressing bacterial survival mechanisms, inhibiting biofilm formation, and reducing antibiotic tolerance and bacterial persistence.

References

1. Amato S.M., Orman M.A., Brynildsen M.P. Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*. *Mol Cell*. V. 50, No. 4 (2013): pp. 475-87. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.04.002.
2. Amato S.M., Brynildsen M.P. Persister heterogeneity arising from a single metabolic stress. *Curr Biol*. V. 25, No. 16 (2015): pp. 2090-8. DOI: 10.1016/j.cub.2015.06.034.

3. Anderson B.W., Liu K., Wolak C., Dubiel K., She F. et al. Evolution of (p)ppGpp-HPRT regulation through diversification of an allosteric oligomeric interaction. *Elife*. 8:e47534 (2019). DOI: 10.7554/eLife.47534.
4. Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. V. 305, No. 5690 (2004): pp. 1622-5. DOI: 10.1126/science.1099390.
5. Beljantseva J., Kudrin P., Jimmy S., Ehn M., Pohl R. et al. Molecular mutagenesis of ppGpp: turning a RelA activator into an inhibitor. *Nature Scientific Reports*. V. 7, 41839 (2017). DOI: 10.1038/srep41839.
6. Bhaskar A., De Piano C., Gelman E., McKinney J.D., Dhar N. Elucidating the role of (p)ppGpp in mycobacterial persistence against antibiotics. *IUBMB Life*. V. 70, No. 9 (2018): pp. 836-844. DOI: 10.1002/iub.1888.
7. Brauner A., Fridman O., Gefen O., Balaban N.Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*. V. 14 (2016): pp. 320–330. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.34.
8. Burgos H.L., O'Connor K., Sanchez-Vazquez P., Gourse R.L. Roles of transcriptional and translational control mechanisms in regulation of ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. V. 199, No. 21 (2017): e00407-17. DOI: 10.1128/JB.00407-17.
9. Cashel M., Gallant J. Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature*. V. 221, No. 5183 (1969): pp. 838-41. DOI: 10.1038/221838a0.
10. Chowdhury N., Kwan B.W., Wood T.K. Persistence increases in the absence of the alarmone guanosine tetraphosphate by reducing cell growth. *Scientific Reports*. V. 6 (2016): 20519. DOI: 10.1038/srep20519.
11. Cohen N.R., Lobritz M.A., Collins J.J. Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe*. V. 13, No. 6 (2013): pp. 632-42. DOI: 10.1016/j.chom.2013.05.009.
12. Corrigan R.M., Bellows L.E., Wood A., Gründling A. ppGpp negatively impacts ribosome assembly affecting growth and antimicrobial tolerance in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. V. 113, No. 12 (2016): E1710-9. DOI: 10.1073/pnas.1522179113.
13. Dahl J., Kraus C.N., Boshoff H.I., Doan B., Foley K., Avarbock D. et al. The role of Rel_{Mtb}-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 100 (2003): pp. 10026–10031. DOI: 10.1073/pnas.1631248100a.
14. Danchik C., Wang S., Karakousis P.C. Targeting the *Mycobacterium tuberculosis* stringent response as a strategy for shortening tuberculosis treatment. *Front Microbiol*. V. 12 (2021): 744167. DOI: 10.3389/fmicb.2021.744167.
15. Davis K.M., Isberg R.R. Defining heterogeneity within bacterial populations via single cell approaches. *Bioessays*. V. 38, No. 8 (2016): pp. 782-90. DOI: 10.1002/bies.201500121.
16. Diez S., Ryu J., Caban K., Gonzalez R.L. Jr., Dworkin J. The alarmones (p)ppGpp directly regulate translation initiation during entry into quiescence. *Proc Natl Acad Sci USA*. V. 117, No. 27 (2020): pp. 15565-15572. DOI: 10.1073/pnas.1920013117.
17. Dutta N.K., Klinkenberg L.G., Vazquez M.-J. et al. Inhibiting the stringent response blocks *Mycobacterium tuberculosis* entry into quiescence and reduces persistence. *Sci Adv*. V. 5, No. 3 (2019): eaav2104. DOI: 10.1126/sciadv.aav2104.
18. Ehrh S., Schnappinger D., Rhee K.Y. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*. V. 16, No. 8 (2018): pp. 496–507. DOI: 10.1038/s41579-018-0013-4.
19. Fernández-Coll L., Maciag-Dorszynska M., Tailor K., Vadia S., Levin P.A. et al. The absence of (p)ppGpp renders initiation of *Escherichia coli* chromosomal DNA synthesis independent of growth rates. *mBio*. V. 11, No. 2 (2020): e03223-19. DOI: 10.1128/mBio.03223-19.
20. Giramma C.N., DeFoer M.B., Wang J.D. The alarmone (p)ppGpp regulates primer extension by bacterial primase. *J Mol Biol*. V. 433, No. 19 (2021): 167189. DOI: 10.1016/j.jmb.2021.167189.
21. Gong W., Wu X. Differential diagnosis of latent tuberculosis infection and active tuberculosis: a key to a successful tuberculosis control strategy. *Front Microbiol*. V. 12 (2021): 745592. DOI: 10.3389/fmicb.2021.745592.
22. Grimbergen A.J., Siebring J., Solopova A., Kuipers O.P. Microbial bet-hedging: the power of being different. *Curr Opin Microbiol*. V. 25 (2015): pp. 67-72. DOI: 10.1016/j.mib.2015.04.008.
23. Gupta K.R., Kasetty S., Chatterji D. Novel functions of (p)ppGpp and cyclic di-GMP in mycobacterial physiology revealed by phenotype microarray analysis of wild-type and isogenic strains of *Mycobacterium smegmatis*. *Appl Environ Microbiol*. V. 81, No. 7 (2015): pp. 2571–8. DOI: 10.1128/AEM.03999-14.
24. Gupta K.R., Arora G., Mattoo A., Sajid A. Stringent response in mycobacteria: from biology to therapeutic potential. *Pathogens*. V. 10, No. 11 (2021): 1417. DOI: 10.3390/pathogens10111417.
25. Harms A., Maisonneuve E., Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*. V. 354, No. 6318 (2016): aaf4268. DOI: 10.1126/science.aaf4268.
26. Henry T.C., Brynildsen M.P. Development of Persister-FACSeq: a method to massively parallelize quantification of persister physiology and its heterogeneity. *Sci Rep*. V. 6 (2016): 25100. DOI: 10.1038/srep25100.

27. Hobbs J.K., Boraston, A.B. (p)ppGpp and the stringent response: an emerging threat to antibiotic therapy. *ACS Infect Dis.* V. 5, No. 9 (2019): pp.1505-1517. DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00204.
28. Hong S.H., Wang X., O'Connor H.F., Benedik M.J., Wood T.K. Bacterial persistence increases as environmental fitness decreases. *Microb Biotechnol.* V. 5, No. 4 (2012): pp. 509-522. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00327.x.
29. Huaman M.A., Sterling T.R. Treatment of Latent Tuberculosis Infection-An Update. *Clin Chest Med.* V. 40, No. 4 (2019): pp. 839-848. DOI: 10.1016/j.ccm.2019.07.008.
30. Irving S.E., Choudhury N.R., Corrigan R.M. The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* V. 19, No. 4 (2021): pp. 256-271. DOI: 10.1038/s41579-020-00470-y.
31. Izutsu K., Wada A., Wada C. Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp. *Genes Cells.* V. 6, No. 8 (2001): pp. 665-76. DOI: 10.1046/j.1365-2443.2001.00457.x.
32. Kaldalu N., Hauryliuk V., Tenson T. Persisters – as elusive as ever. *Appl Microbiol Biotechnol.* V. 100, No. 15 (2016): pp. 6545-6553. DOI: 10.1007/s00253-016-7648-8.
33. Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters.* V. 230 (2004): pp. 13-18.
34. Kester J.C., Fortune S.M. Persisters and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* V. 49, No. 2 (2014): pp. 91-101. DOI: 10.3109/10409238.2013.869543.
35. Kim H.Y., Go J., Lee K.M., Oh Y.T., Yoon S.S. Guanosine tetra- and pentaphosphate increase antibiotic tolerance by reducing reactive oxygen species production in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem.* V. 293, No. 15 (2018): pp. 5679-5694. DOI: 10.1074/jbc.RA117.000383.
36. Klapper I., Dockery J. Mathematical Description of Microbial Biofilms. *SIAM Review.* V. 52, No. 2 (2010): pp. 221-265. DOI: 10.1137/080739720.
37. Klinkenberg L.G., Lee J., Bishai W.R., Karakousis P.C. The stringent response is required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in Guinea pigs. *J. Infect. Dis.* V. 202 (2010): pp. 1397-1404. DOI: 10.1086/656524.
38. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell.* V. 130, No. 5 (2007): pp. 797-810. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.049.
39. Korch S.B., Henderson T.A., Hill T.M. Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol.* V. 50, No. 4 (2003): pp. 1199-213. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03779.x.
40. Kushwaha G.S., Oyeyemi B.F., Bhavesh N.S. Stringent response protein as a potential target to intervene persistent bacterial infection. *Biochimie.* V. 165 (2019): pp. 67-75. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.07.006.
41. Kushwaha G.S., Patra A., Bhavesh N.S. Structural analysis of (p)ppGpp reveals its versatile binding pattern for diverse types of target proteins. *Front Microbiol.* V. 11 (2020): 575041. DOI: 10.3389/fmicb.2020.575041.
42. Kwan B.W., Valenta J.A., Benedik M.J., Wood T.K. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrob Agents Chemother.* V. 57, No. 3 (2013): pp. 1468-1473. DOI: 10.1128/AAC.02135-12.
43. Lewis K. Persister cells. *The Annual Review of Microbiology.* V. 64 (2010): pp. 357-72. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134306.
44. Li Y., Sun F., Zhang W. Bedaquiline and delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Promising but challenging. *Drug Dev Res.* V. 80, No. 1 (2019): pp. 98-105. DOI: 10.1002/ddr.21498.
45. Liu H., Xiao Y., Nie H., Huang Q., Chen W. Influence of (p)ppGpp on biofilm regulation in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbiol Res.* V. 204 (2017): pp. 1-8. DOI: 10.1016/j.micres.2017.07.003.
46. Maisonneuve E., Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell.* 157, No. 3 (2014): pp. 539-48. DOI: 10.1016/j.cell.2014.02.050.
47. Mandal S., Njikan S., Kumar A., Early J.V., Parish T. The relevance of persisters in tuberculosis drug discovery. *Microbiology.* V. 165, No. 5 (2019): pp. 492-499. DOI: 10.1099/mic.0.000760.
48. Maciag M., Kochanowska M., Lyzeń R., Wegrzyn G., Szalewska-Pałasz A. ppGpp inhibits the activity of *Escherichia coli* DnaG primase. *Plasmid.* V. 63, No. 1 (2019): pp. 61-7. DOI: 10.1016/j.plasmid.2009.11.002.
49. Mechold U., Potrykus K., Murphy H., Murakami K.S., Cashel M. Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* V. 41, No. 12 (2013): pp. 6175-89. DOI: 10.1093/nar/gkt302.
50. Merrikh H., Ferrazzoli A.E., Lovett S.T. Growth phase and (p)ppGpp control of IraD, a regulator of RpoS stability, in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* V. 191, No. 24 (2009): pp. 7436-46. DOI: 10.1128/JB.00412-09.
51. Mok W.W., Orman M.A., Brynildsen M.P. Impacts of global transcriptional regulators on persister metabolism. *Antimicrob Agents Chemother.* V. 59, No. 5 (2015): pp. 2713-9. DOI: 10.1128/AAC.04908-14.
52. Murakami K.S. Structural biology of bacterial RNA polymerase. *Biomolecules.* V. 5, No. 2 (2015): pp. 848-64. DOI: 10.3390/biom5020848.

53. Nguyen D. et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*. V. 334 (2011): pp. 982-986. DOI: 10.1126/science.1211037.
54. Orman M.A., Brynildsen M.P. Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrob Agents Chemother*. V. 57, No. 7 (2013): pp. 3230-3239. DOI: 10.1128/AAC.00243-13.
55. Pacios, O., Blasco, L., Bleriot, I. et al. (p)ppGpp and its role in bacterial persistence: new challenges. *Antimicrob Agents Chemother*. V. 64, No. 10 (2020): e01283-20. DOI: 10.1128/AAC.01283-20.
56. Potrykus K., Murphy H., Philippe N., Cashel M. ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli*. *Environmental Microbiology*. V. 13, No. 3 (2011): pp. 563-575. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02357.x.
57. Prax M., Bertram R. Metabolic aspects of bacterial persisters. *Front Cell Infect Microbiol*. V. 4 (2014): 148. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00148.
58. Primm T.P., Andersen S.J., Mizrahi V., Avarbock D., Rubin H., Barry C.E. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J Bacteriol*. V. 182, No. 17 (2000): pp. 4889-4898. DOI: 10.1128/jb.182.17.4889-4898.2000.
59. Pu Y., Li Y., Jin X., Tian T., Qi M., et al. ATP-dependent dynamic protein aggregation regulates bacterial dormancy depth critical for antibiotic tolerance. *Molecular Cell*. V. 73 (2019): pp. 143-156. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.10.022.
60. Rodionov D.G., Ishiguro E.E. Direct correlation between overproduction of guanosine 3',5'-bisphosphate (ppGpp) and penicillin tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. V. 177, No. 15 (1995): pp. 4224-9. DOI: 10.1128/jb.177.15.4224-4229.1995.
61. Salcedo-Sora J. E., Kell D.B. A quantitative survey of bacterial persistence in the presence of antibiotics: towards antipersisters antimicrobial discovery. *Antibiotics*. V. 9, No. 8 (2020): 508. DOI: 10.3390/antibiotics9080508.
62. Sebastian J. et al. De novo emergence of genetically resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* from the persistence phase cells formed against antituberculosis drugs in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. V. 61, No. 2 (2017): e01343-16. DOI: 10.1128/AAC.01343-16.
63. Shan Y., Gandt A.B., Lewis K. et al. ATP-dependent persister formation in *Escherichia coli*. *mBio*. V. 8, No. 1 (2017): e02267-16. DOI: 10.1128/mBio.02267-16.
64. Sinha S.K., Neethu R.S., Devarakonda Y., Rathi A., Regatti P.R. et al. Tale of Twin Bifunctional Second Messenger (p)ppGpp Synthetases and Their Function in Mycobacteria. *ACS Omega*. V. 8, No. 36 (2023): pp. 32258-32270. DOI: 10.1021/acsomega.3c03557.
65. Starosta A.L., Lassak J., Jung K., Wilson D.N. The bacterial translation stress response. *FEMS Microbiol Rev*. V. 38, No. 6 (2014): pp. 1172-201. DOI: 10.1111/1574-6976.12083.
66. Stokes J.M., Lopatkin A.J., Lobritz M.A., Collins J.J. Bacterial metabolism and antibiotic efficacy. *Cell Metab*. V. 30, No. 2 (2019): pp. 251-259. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.06.009.
67. Syal K., Flentie K., Bhardwaj N., Maiti K., Jayaraman N. et al. Synthetic (p)ppGpp analogue is an inhibitor of stringent response in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. V. 61, No. 6 (2017): e00443-17. DOI: 10.1128/AAC.00443-17.
68. Syal K., Rs N., Reddy M.V.N.J. The extended (p)ppGpp family: new dimensions in stress response. *Curr Res Microb Sci*. V. 2 (2021): 100052. DOI: 10.1016/j.crmicr.2021.100052.
69. Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Sidorov R.Yu., Nesterova L.Yu., Akhova A.V. et al. A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases. *Cell Chemical Biology*. V. 28, No. 10 (2021): pp. 1420-1432.e9. DOI: 10.1016/j.chembiol.2021.01.018.
70. Viducic D., Ono T., Murakami K. et al. Functional analysis of *spoT*, *relA* and *dksA* genes on quinolone tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* under nongrowing condition. *Microbiol Immunol*. V. 50, No. 4 (2006): pp. 349-57. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2006.tb03793.x.
71. Vogwill T., Comfort A.C., Furió V., MacLean R.C. Persistence and resistance as complementary bacterial adaptations to antibiotics. *J Evol Biol*. V. 29, No. 6 (2016): pp. 1223-1233. DOI: 10.1111/jeb.12864.
72. Wagner R. Regulation of ribosomal RNA synthesis in *E. coli*: effects of the global regulator guanosine tetraphosphate (ppGpp). *J Mol Microbiol Biotechnol*. V. 4, No. 3 (2002): pp. 331-40.
73. Warner D.F., Mizrahi V. Tuberculosis chemotherapy: the influence of bacillary stress and damage response pathways on drug efficacy. *Clin Microbiol Rev*. V. 19(3) (2006): 558-70. DOI: 10.1128/CMR.00060-05.
74. Weiss L.A., Stallings C.L. Essential roles for *Mycobacterium tuberculosis* Rel beyond the production of (p)ppGpp. *J. of Bacteriol*. V. 195, No. 24 (2013): pp. 5629-38. DOI: 10.1128/JB.00759-13.
75. Wexselblatt E., Oppenheimer-Shaanan Y., Kaspary I. et al. Relacin, a novel antibacterial agent targeting the stringent response. *PLoS Pathog*. V. 8, No. 9 (2012): e1002925. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002925.
76. Winther K.S., Roghanian M., Gerdes K. Activation of the stringent response by loading of RelA-tRNA complexes at the ribosomal A-site. *Mol Cell*. V. 70, No. 1 (2018): pp. 95-105.e4. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.02.033.

77. Wood T.K., Knabel S.J., Kwan B.W. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 79, No. 23 (2013): 7116-21. DOI: 10.1128/AEM.02636-13.
78. Wu J., Long Q., Xie J. (p)ppGpp and drug resistance. *J Cell Physiol*. 224. No. 2 (2010): pp. 300-4. DOI: 10.1002/jcp.22158.
79. Wu Y., Vulić M., Keren I., Lewis K. Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrob Agents Chemother*. V. 56, No. 9 (2012): pp. 4922-6. DOI: 10.1128/AAC.00921-12.
80. Yan J., Bassler B.L. Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. *Cell Host Microbe*. V. 26, No. 1 (2019): pp. 15-21. DOI: 10.1016/j.chom.2019.06.002.
81. Zhang Y. Persisters, persistent infections and the Yin–Yang model. *Emerging Microbes and Infections*. V. 3, No. 1 (2014): e3. DOI: 10.1038/emi.2014.3.
82. Zhao Y., Cai Y., Chen Z., Li H., et al. SpoT-mediated NapA upregulation promotes oxidative stress-induced *Helicobacter pylori* biofilm formation and confers multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. V. 65, No. 5 (2021): e00152-21. DOI: 10.1128/AAC.00152-21.
83. Zheng E.J., Stokes J.M., Collins J.J. Eradicating bacterial persisters with combinations of strongly and weakly metabolism-dependent antibiotics. *Cell Chem Biol*. V. 27, No. 12 (2020): pp. 1544-1552.e3. DOI: 10.1016/j.chembiol.2020.08.015.
84. Zamakhaev M.V., Goncharenko A.V., Shumkov M.S. [Toxin-antitoxin systems and bacterial persistence (Review)]. *Appl. Biochem. Microbiol*. V. 55, No. 6 (2019): pp. 571-581. (In Russ.). DOI: 10.1134/S055510991906014X.

Статья поступила в редакцию 03.11.2023; одобрена после рецензирования 08.11.2023; принята к публикации 20.11.2023.

The article was submitted 03.11.2023; approved after reviewing 08.11.2023; accepted for publication 20.11.2023.

Информация об авторах

Р. Ю. Сидоров – инженер лаборатории адаптации микроорганизмов, младший научный сотрудник лаборатории органического синтеза;

А. Г. Ткаченко – д-р мед. наук, профессор, зав. лаборатории адаптации микроорганизмов, профессор кафедры микробиологии и иммунологии.

Information about the authors

R. Yu. Sidorov – engineer of the laboratory of microbial adaptation, junior researcher at the Laboratory of organic synthesis;

A. G. Tkachenko – doctor of medicine, professor, head of the Laboratory of microbial adaptation, professor of the Department of Microbiology and Immunology.

Вклад авторов:

Сидоров Р. Ю. – написание исходного текста.

Ткаченко А. Г. – научное руководство; доработка текста.

Contribution of the authors:

Sidorov R. Yu. – writing the draft.

Tkachenko A.G. – scientific management; follow on revision of the text.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.22

doi: 10.17072/1994-9952-2023-4-367-374.

**Влияние оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов
CBR-384 и CBR-386 на дыхательную активность и уровень
внеклеточных серосодержащих соединений у бактерий
*Escherichia coli***

**Г. А. Триандафилова¹, А. В. Тюленев¹, Н. Г. Музыка¹, Г. В. Смирнова¹,
О. Н. Октябрьский¹**

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Автор, ответственный за переписку: Олег Николаевич Октябрьский, oktyabr@iegm.ru

Аннотация. Изучена биологическая активность двух представителей оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов CBR-384 и CBR-386, планируемых к использованию в качестве лекарственных препаратов, на растущие аэробно грамотрицательные бактерии *Escherichia coli*. Соединение CBR-384 полностью ингибировало скорость роста и накопление биомассы, оцениваемое по измерению оптической плотности (OD₆₀₀). Непрерывная регистрация растворенного кислорода (dO₂) электродом Кларка прямо в растущей культуре показало, что CBR-384 вызывал быстрое и необратимое повышение уровня кислорода в среде, что свидетельствовало о снижении дыхательной активности клеток. По времени, фаза быстрого падения дыхания совпадала с фазой снижения скорости роста. В аэробных культурах *E. coli* дыхательная активность тесно связана с генерацией мембранного потенциала. Однако при действии CBR-384 было обнаружено лишь небольшое, но статистически значимое снижение мембранного потенциала, измеряемого с помощью флуоресцентного красителя DiBAC₄(3). Известно, что в аэробных культурах *E. coli*, растущих на сульфате, как источнике серы, стресс-индуцируемое ингибирование роста сопровождается увеличением экстраклеточного глутатиона (GSH) и экспортом H₂S. Использование сульфид-специфического электрода выявило, что при остановке роста *E. coli* при действии CBR-384 также наблюдается экспорт сульфида в среду. В этих условиях отмечено также увеличение внеклеточного GSH. Влияние CBR-386 на *E. coli*, оцениваемое по четырем указанным параметрам, было выражено слабее. Различия в биологической активности CBR-384 и CBR-386 могут быть связаны с различиями их структур.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, дыхание, мембранный потенциал, глутатион, H₂S

Для цитирования: Влияние оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов CBR-384 и CBR-386 на дыхательную активность и уровень внеклеточных серосодержащих соединений у бактерий *Escherichia coli* / Г. А. Триандафилова, А. В. Тюленев, Н. Г. Музыка, Г. В. Смирнова, О. Н. Октябрьский // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 4. С. 367–374. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-367-374>.

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы АААА-А19-119112290009-1, и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-34-90016. Авторы выражают благодарность Ольге Петровне Красных за предоставленные образцы соединений CBR-384 и CBR-386.

MICROBIOLOGY

Original article

**Influence of oxo-derivatives of nitrogen containing heterocycles
CBR-384 and CBR-386 on respiratory activity and the level of
extracellular sulfur containing compounds in *Escherichia coli***

**G. A. Triandafilova¹, A. V. Tyulenev¹, N. G., Muzyka¹, G. V. Smirnova¹,
O. N. Oktyabrsky¹**

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center RAS, Perm, Russia
Corresponding author: Oleg N. Oktyabrsky, oktyabr@iegm.ru

Abstract. The biological activity of two representatives of oxo-derivative nitrogen-containing heterocycles CBR-384 and CBR-386, planned for use as drugs, on growing aerobically gram-negative bacteria *Escherichia coli* was studied. Compound CBR-384 completely inhibited growth rate and biomass accumulation as measured by optical density (OD₆₀₀). Continuous recording of dissolved oxygen (dO₂) with a Clark electrode directly in the growing culture showed that CBR-384 caused a rapid and irreversible increase in oxygen levels in the medium, which indicated a decrease in the respiratory activity of cells. In time, the phase of rapid decline in respiration coincided with the phase of decreased growth rate. In aerobic cultures of *E. coli*, respiratory activity is closely related to the generation of membrane potential. However, only a small, but statistically significant, decrease in membrane potential, measured using the fluorescent dye DiBAC₄(3), was found with CBR-384. It is known that in aerobic *E. coli* cultures growing on sulfate as a sulfur source, stress-induced growth inhibition is accompanied by an increase in extracellular glutathione (GSH) and H₂S export. The use of a sulfide-specific electrode revealed that when *E. coli* growth is stopped by CBR-384, sulfide is also exported into the medium. Under these conditions, an increase in extracellular GSH was also noted. The effect of CBR-386 on *E. coli*, assessed by these four parameters, was less pronounced. The differences in the biological activities of CBR-384 and CBR-386 may be due to differences in their structures.

Keywords: *Escherichia coli*; respiration; membrane potential; glutathione; H₂S

For citation: Triandafilova G. A., Tyulenev A. V., Muzyka N. G., Smirnova G. V., Oktyabrsky O. N. [Influence of oxo-derivatives of nitrogen containing heterocycles CBR-384 and CBR-386 on respiratory activity and the level of extracellular sulfur containing compounds in *Escherichia coli*]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2023): pp. 367-374. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-367-374>.

Acknowledgments: the research was supported by the state assignment AAAA-A19-119112290009-1 and by the grant of Russian Foundation of Basic Research, project № 20-34-90016. The authors are grateful to Krasnykh Olga Petrovna for providing samples of compounds CBR-384 and CBR-386.

Введение

Несмотря на большое разнообразие лекарственных веществ, присутствующих на мировом рынке, поиск и создание новых препаратов остается актуальной задачей. В первую очередь это связано с поиском более безопасных для организма человека веществ, обладающих пониженным общетоксическим действием и отсутствием побочных эффектов. В этой связи все большее внимание уделяется исследованию влияния лекарственных препаратов на микробиом человека [Marchesi, Ravel, 2015]. Активность микроорганизмов, входящих в микробиом, играет важную роль в пищеварении, секреции полезных метаболитов, в том числе витамина К и витаминов группы В. Изменения в составе микробиома коррелируют с заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и нервной системы [Kho, Lal, 2018; Rowland et al., 2018]. При пероральном применении лекарственного вещества происходит его взаимодействие с представителями кишечной микрофлоры, которое с одной стороны, может привести к изменению микробиомного состава. С другой стороны, бактерии способны к биотрансформации лекарственных препаратов, изменяя их фармакокинетические и фармакодинамические свойства. Возможно усиление токсичности препарата, либо, наоборот, его трансформация в активную молекулу [Enright et al., 2016]. В связи со сложностью культивирования *in vitro* отдельных представителей микробиома, первым шагом в прогнозировании взаимодействия лекарственного препарата с микробиомом может стать исследование влияния испытуемого соединения на таких хорошо изученных обитателей желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), как *Escherichia coli*. Эта бактерия является симбиотом ЖКТ; в то же время известны патогенные штаммы *E. coli*, вызывающие ряд инфекционных заболеваний [White et al., 2011].

Цель настоящей работы – изучение влияния двух представителей оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов (ОАГ), планируемых к использованию в качестве лекарственных препаратов, на ростовые параметры, дыхательную активность, мембранный потенциал и уровень двух внеклеточных серосодержащих соединений: глутатиона и сульфид-иона. Представители ОАГ, содержащие енаминоновый фрагмент (N=C=C=O), рассматриваются как универсальные блоки для создания новых биологически активных молекул. Среди представителей этой группы были обнаружены вещества, обладающие противомикробной, анальгетической, противовоспалительной, противосудорожной, противораковой активностью [Boteva et al., 2019; J. Gao et al., 2023; Jiang et al., 2020].

Материалы и методы исследования

Штаммы бактерий и условия культивирования. В качестве объектов исследований использовали штаммы *Escherichia coli* BW25113 полученные из *E. coli* Genetic Stock Center (CGSC) и NM3021 (коллекция ЛФГМ). Бактерии выращивали в аэробных условиях на синтетической минимальной среде M9 (Na₂HPO₄ · 12H₂O – 15.13 г/л; KH₂PO₄ – 3 г/л; NH₄Cl – 1 г/л; NaCl – 0.5 г/л; MgSO₄ · 7H₂O – 0.246 г/л; CaCl₂ – 0.011 г/л) [Miller, 1972] с добавлением 0.15%-ной глюкозы. После центрифугирования клетки из

ночной культуры ресуспендировали в 100 мл свежей среды до значения оптической плотности при 600 нм $OD_{600} = 0.05-0.07$ и далее выращивали при 37°C в колбах объемом 250 мл на качалках (ИБП РАН, Пушкино) при частоте вращения 150 об/мин. Далее часть культуры пересевали в колбы на 250 мл и выращивали в условиях, описанных выше. За ростом бактерий следили по изменению OD_{600} , измеряемому на фотометре КФК-3.

Удельную скорость роста культуры (μ) рассчитывали по формуле

$$\mu = \frac{\ln OD_{600}(t_2) - \ln OD_{600}(t_1)}{t_2 - t_1},$$

где $OD_{600}(t_2)$ и $OD_{600}(t_1)$ – оптическая плотность культуры, измеренная при длине волны 600 нм, во время t_2 и t_1 .

Изменения мембранного потенциала исследовали по методу [Wickens et al., 2000]. Бактериальную культуру (180 мкл) смешивали с 20 мкл раствора DiBAC₄(3) с концентрацией 100 мкг/мл и выдерживали в темноте при 37°C в течение 10 мин. Затем 10 мкл образца наносили на предметное стекло с 1%-ной агарозой и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM2000 (фильтр-система I3). Общее количество клеток подсчитывали в проходящем свете. Для каждого образца анализировали не менее 800 клеток.

Измерение парциального давления кислорода и уровня внеклеточного сульфид-иона. Уровень растворенного кислорода (dO_2) в культурах *E. coli* непрерывно измеряли непосредственно в колбах с помощью кислородного электрода Clarke InPro 6800 (Mettler Toledo). Для записи данных использовали контроллер dO_2/pH ферментера BioFlo 110 (New Brunswick Scientific Co., США).

Концентрацию экстраклеточного сульфид-иона определяли с помощью сульфид-специфичного ионо-селективного электрода XC-S2--001 (Сенсорные Системы, Россия) и электрода сравнения и компьютерного pH/иономера срХ-2 (ИБП Пушкино, Россия). Концентрацию сульфидов в среде рассчитывали по стандартной кривой, построенной с известными количествами Na₂S [Tyulenev et al., 2018].

Определение концентрации внеклеточного глутатиона выполняли с помощью модифицированного метода Титца [Tietze, 1969; Smirnova, Oktyabrsky, 2012]. Суспензию клеток отбирали по 1.5 мл и пропускали через мембранный фильтр с размером пор 0.45 мкм. Измерение проводили с помощью метода рециркуляции 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) (DTNB) – глутатионредуктазы. 240 мкл пробы добавляли к смеси 820 мкл буфера фосфата натрия (pH 7.5), 120 мкл DTNB и 6 мкл глутатионредуктазы. Анализ начинали добавлением 12 мкл NADPH на спектрофотометре Shimadzu UV-1700. Изменение OD_{412} за 6-минутный период использовали для расчета общего глутатиона по калибровочным кривым, построенным по стандартным растворам глутатиона.

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Excell и Statistica 6.0, вычисляя среднее значение, стандартную ошибку и доверительный интервал. Каждый результат показан как среднее значение не менее трех независимых экспериментов \pm стандартная ошибка среднего.

Результаты и их обсуждение

Слежение за изменениями оптической плотности (OD_{600}) и удельной скорости роста (μ) показало, что в описываемых условиях CBR-384 через 15 мин. после добавления к растущим *E. coli* полностью и необратимо ингибировал рост бактерий. Ингибирующее действие CBR-386 на рост *E. coli* было выражено в меньшей степени. В конце инкубации оптическая плотность и скорость роста культуры, обработанной этим соединением, составляли 56 и 35% соответственно от значения в контроле ($P < 0.05$). Выявляются две фазы изменения скорости роста при действии CBR-386 и в контроле, при этом, в первом случае, фазовые изменения выражены в большей степени (рис. 1).

Для изучения влияния CBR-384 и CBR-386 на дыхание бактерий было прослежено изменение содержания растворенного кислорода в растущей культуре *E. coli* 25113 при действии этих веществ, в концентрациях равных минимальной ингибирующей концентрации (МИК). В культурах без добавления испытуемых соединений накопление биомассы в растущих *E. coli* сопровождалось постепенным снижением растворенного кислорода (dO_2), связанным с его потреблением в процессе дыхания. Добавление CBR-384 приводило к быстрому и необратимому повышению уровня кислорода в среде (рис. 2), что свидетельствовало о снижении дыхательной активности клеток. По времени, фаза быстрого падения dO_2 совпадала с фазой снижения скорости роста (рис. 1Б).

В течение первых 15 мин. после добавления CBR-386 в растущую культуру *E. coli* уровень кислорода возрастал, свидетельствуя о снижении дыхательной активности. Затем бактерии возобновляли дыхание с

той же скоростью, как в контрольной культуре, и через 60 мин. наблюдалось новое кратковременное ингибирование дыхания, после чего клетки вновь его восстанавливали (рис. 2). Примечательно, что временной активации дыхания через 15 мин. после добавления CBR-386, соответствовало такое же по времени увеличение скорости роста (рис. 1Б). В целом, наблюдаемые изменения dO_2 указывают на то, что действие CBR-386 также сопровождалось снижением дыхательной активности *E. coli*, хотя и в меньшей степени, чем в случае с CBR-384. Это соответствует и меньшей бактериостатической активности CBR-386 по сравнению с CBR-384 (рис. 1).

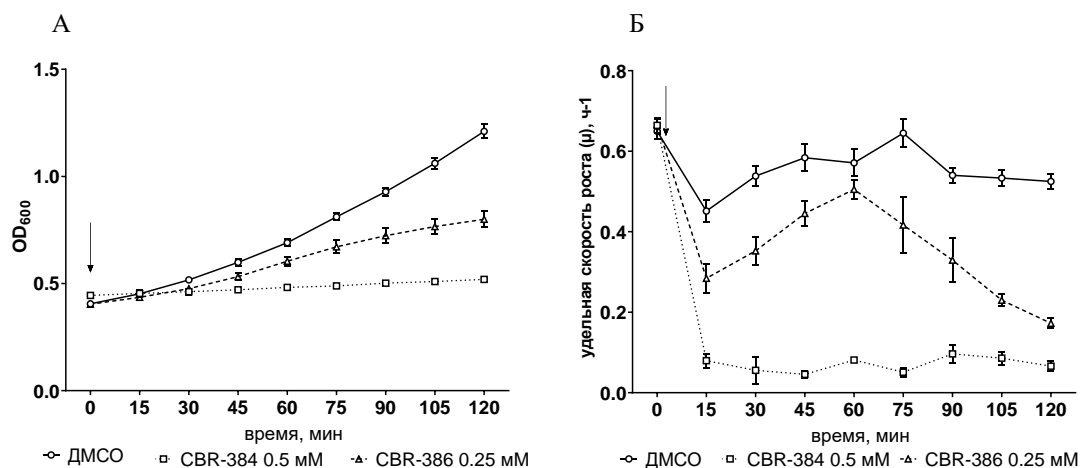


Рис. 1. Влияние CBR-384 и CBR-386 на накопление биомассы (А) и скорость роста (Б) бактерий *E. coli* BW25113

[Effect of CBR-384 and CBR-386 on biomass accumulation (A) and growth rate (B) of *E. coli* BW25113 bacteria]

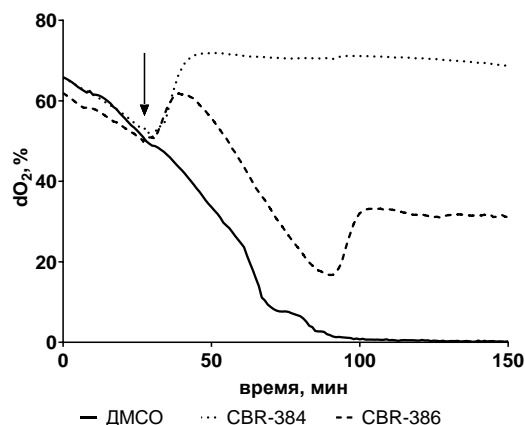


Рис. 2. Влияние CBR-384 и CBR-386 в концентрации, равной МИК, на содержание растворенного кислорода в растущей культуре *E. coli* BW25113

[Effect of CBR-384 and CBR-386 at the MIC concentration on the content of dissolved oxygen in a growing culture of *E. coli* BW25113]

Цитоплазматическая мембрана бактерий выполняет ряд важных функций, включая транспорт веществ и поддержание электрохимического градиента протонов. Диссипация мембранного потенциала может рассматриваться как один из показателей вредного действия факторов внешней среды. Изменение мембранного потенциала при действии соединений CBR-384 и CBR-386 в концентрациях, равных $\frac{1}{2}$ МИК, оценивали с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного красителя DiBAC₄(3). Отрицательно заряженный DiBAC₄(3) не может проникнуть в активные клетки из-за своего внутреннего отрицательного заряда. Клетки, окрашенные DiBAC₄(3), считаются деполяризованными клетками.

В отсутствие какой-либо обработки доля флуоресцирующих клеток в культуре *E. coli* BW25113 составляла не более 2% и не менялась в процессе роста в периодической культуре. Наблюдалось небольшое, но статистически достоверное увеличение доли флуоресцирующих клеток (эквивалентное снижению мембранного потенциала) через 60 и 120 мин. соответственно после добавления CBR-384 и CBR-386 (рис. 3).

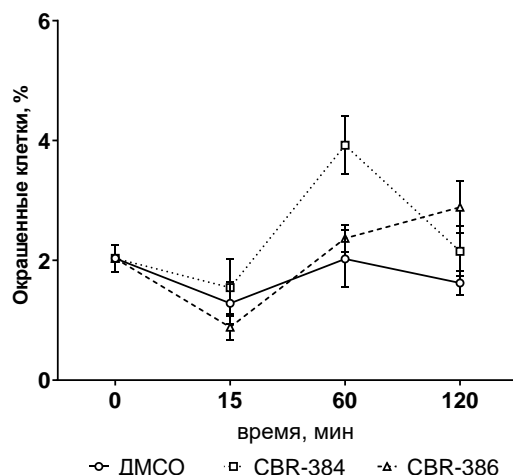


Рис. 3. Изменение мембранного потенциала при действии CBR-384 и CBR-386 на *E. coli* BW25113

[Changes in membrane potential under the action of CBR-384 and CBR-386 on *E. coli* BW25113]

В аэробных условиях генерация мембранного потенциала бактериями *E. coli* осуществляется, главным образом, за счет работы дыхательной цепи. В этой связи, обращает внимание тот факт, что при действии CBR-384 одновременно наблюдается увеличение числа клеток, потерявших мембранный потенциал, и значительное снижение дыхательной активности (см. рис. 2).

У *E. coli*, как и у других грамотрицательных бактерий, глутатион (GSH) выполняет роль главного редокс-буфера [Smirnova, Oktyabrsky, 2005]. Было показано, что при некоторых стрессовых воздействиях, сопровождающихся ингибированием роста, в культурах *E. coli* наблюдается значительное повышение внутри- и внеклеточного глутатиона [Smirnova et al., 2015]. Представляло интерес проверить этот эффект при действии CBR-384 и CBR-386.

В наших условиях, CBR-384 и CBR-386 также увеличивали уровень внеклеточного глутатиона. Наибольшее и статистически достоверное ($P < 0.05$) увеличение внеклеточного глутатиона по сравнению с контролем наблюдалось в фазе быстрого ингибирования роста (рис. 4).

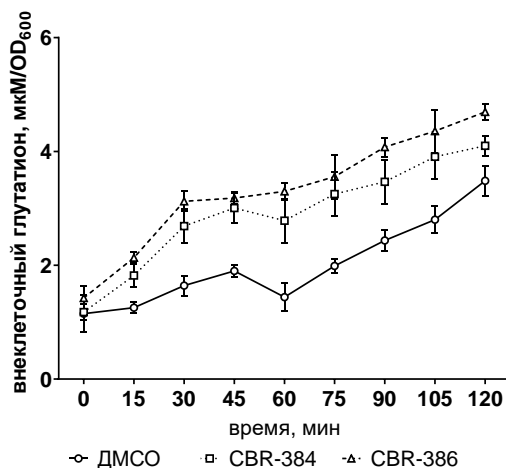


Рис. 4. Влияние CBR-384 и CBR-386 в концентрации, равной $\frac{1}{2}$ МИК, на уровень внеклеточного глутатиона в растущей культуре *E. coli* BW25113

[Effect of CBR-384 and CBR-386 at $\frac{1}{2}$ MIC concentration on the level of extracellular glutathione in a growing culture of *E. coli* BW25113]

Известно, что при росте *E. coli* на минимальных средах с глюкозой и сульфатом в качестве источника серы стресс-индуцируемые остановки роста сопровождаются увеличением в среде не только глутатиона, но и сульфид-ионов [Tyulenev et al., 2018].

При действии CBR-384 на растущую культуру *E. coli* BW25113 наблюдалось значительное изменение потенциала сульфид-специфичного электрода, свидетельствующее об увеличении уровня внеклеточного сульфида, и совпадающее по времени с моментом снижения скорости роста (см. рис. 1). Согласно пока-

заниям электрода, примерно через 30 мин. после добавления CBR-384 уровень сульфида снижался до контрольного значения (рис. 5).

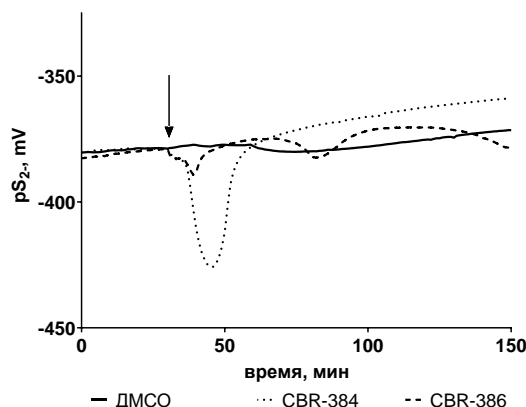


Рис. 5. Обработка растущих *E. coli* BW25113 соединениями CBR-384 и CBR-386 приводит к увеличению внеклеточного сульфид-иона

[Treatment of growing *E. coli* BW25113 with compounds CBR-384 and CBR-386 leads to an increase in extracellular sulfide ion]

При действии CBR-386 наблюдался значительно меньший двухфазный выброс сульфида, чем при действии CBR-384, что соответствовало более низкому бактериостатическому действию первого вещества (см. рис. 1).

Заключение

В настоящей работе изучалась биологическая активность в отношении бактерий *Escherichia coli* двух представителей оксопроизводных азотсодержащих гетероциклов CBR-384 и CBR-386, планируемых к использованию в качестве лекарственных препаратов. Не рассматривалось их использование как антимикробных агентов. В этой связи предполагается, что указанные соединения будут иметь минимум побочных эффектов, в том числе они не должны влиять на активность представителей микробиома человека, примером которых является *E. coli*. Наши исследования показали, что оба соединения оказывают заметное негативное влияние на такие важные физиологические функции этих бактерий, как рост, дыхание, поддержание мембранного потенциала и уровня внеклеточных серосодержащих соединений. Полученные результаты позволят дать более полную характеристику CBR-384 и CBR-386. Следует отметить, что часто для характеристики антимикробного действия препаратов, не предназначенных для использования в качестве антибиотиков, указывается только значение минимальной ингибирующей концентрации (МИК). В связи с возрастанием данных о разностороннем влиянии микробиома на здоровье человека, выявляется необходимость более детального изучения действия на микробиом не только вновь синтезируемых медпрепаратов, но и широко используемых в настоящее время. Актуально выявление наиболее оптимального набора подходов и методов в этой области исследований. Настоящая работа вносит вклад в решение указанной проблемы.

Список источников

1. Boteva A.A. et al. Synthesis and analgesic activity of [b]-annulated 4-quinolones // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019. Vol. 53. P. 616–619. DOI: 10.1007/s11094-019-02048-2
2. Enright E.F. et al. The impact of the gut microbiota on drug metabolism and clinical outcome // *Yale Journal of Biology and Medicine*. 2016. Vol. 89. P. 375–382.
3. Gao J., Hou H., Gao F. Current scenario of quinolone hybrids with potential antibacterial activity against ESKAPE pathogens // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2023. Vol. 247. № 115026. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.115026
4. Jiang S. et al. Anti-cancer activity of benzoxazinone derivatives via targeting c-Myc G-quadruplex structure // *Life Sciences*. 2020. V. 258. № 118252. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118252
5. Kho Z.Y., Lal S.K. The human gut microbiome - a potential controller of wellness and disease // *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. № 1835. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01835
6. Marchesi J.R., Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal // *Microbiome*. 2015. Vol. 3. № 31. DOI: 10.1186/s40168-015-0094-5

7. Miller J.H. Experiments in molecular genetics // New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1972. 466 p.
8. Rowland I. et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components // *European Journal of Nutrition*. 2018. Vol. 57. P. 1–24. DOI: 10.1007/s00394-017-1445-8
9. Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N. Glutathione in bacteria // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. Vol. 70. P. 1199–1211. DOI: 10.1007/s10541-005-0248-3
10. Smirnova G., Muzyka N., Oktyabrsky O. Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells // *Microbiological Research*. 2012. Vol. 167. P. 166-172. DOI: 10.1016/j.micres.2011.05.005
11. Smirnova G.V. et al. Extracellular superoxide provokes glutathione efflux from *Escherichia coli* cells // *Research in Microbiology*. 2015. V. 166. P. 609–617. DOI: 10.1016/j.resmic.2015.07.007
12. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues // *Analytical Biochemistry*. 1969. Vol. 27. P. 502-522. DOI: 10.1016/0003-2697(69)90064-5
13. Tyulenev A.V. et al. The role of sulfides in stress-induced changes of Eh in *Escherichia coli* cultures // *Bioelectrochemistry*. 2018. Vol. 121. P. 11–17. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2017.12.012
14. White A.P. et al. Intergenic sequence comparison of *Escherichia coli* isolates reveals lifestyle adaptations but not host specificity // *Applied Environmental Microbiology*. 2011. Vol. 77. P. 7620–7632. DOI: 10.1128/AEM.05909-11
15. Wickens H.J. et al. Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000. Vol. 44. P. 682–687. DOI: 10.1128/AAC.44.3.682-687.2000
16. Wilson I.D., Nicholson J.K. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity // *Translational Research*. 2017. V. 179. P. 204–222. DOI: 10.1016/j.trsl.2016.08.002

References

1. Boteva A.A., Fefilova I.V., Triandafilova G.A., Maslova V.V., Solodnikov S.Yu., Krasnykh O.P. Synthesis and analgesic activity of [b]-annelated 4-quinolones. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. V. 53 (2019): pp. 616-619. DOI: 10.1007/s11094-019-02048-2
2. Enright E.F., Gahan C.G.M., Joyce S.A., Griffin B.T. The impact of the gut microbiota on drug metabolism and clinical outcome. *Yale Journal of Biology and Medicine*. V. 89 (2016): pp. 375-382.
3. Gao J., Hou H., Gao F. Current scenario of quinolone hybrids with potential antibacterial activity against ESKAPE pathogens. *European Journal of Medicinal Chemistry*. V. 247 (2023): No. 115026. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.115026
4. Jiang S., Awadasseid A., Narva S., Cao S., Tanaka Y., Wu Y., Fu W., Zhao X., Wei C., Zhang W. Anti-cancer activity of benzoxazinone derivatives via targeting c-Myc G-quadruplex structure. *Life Sciences*. V. 258 (2020): No. 118252. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118252
5. Kho Z.Y., Lal S.K. The human gut microbiome - a potential controller of wellness and disease. *Frontiers in Microbiology*. V. 9 (2018): No. 1835. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01835
6. Marchesi J.R., Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. V. 3 (2015). No. 31. DOI: 10.1186/s40168-015-0094-5
7. Miller J.H. Experiments in molecular genetics. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. 466 p.
8. Rowland I., Gibson G., Heinken A., Scott K., Swann J., Thiele I., Tuohy K. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*. V. 57 (2018): pp. 1-24. DOI: 10.1007/s00394-017-1445-8
9. Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N. Glutathione in bacteria. *Biochemistry (Moscow)*. V. 70 (2005): pp. 1199-1211. DOI: 10.1007/s10541-005-0248-3
10. Smirnova G., Muzyka N., Oktyabrsky O. Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells. *Microbiological Research*. V. 167 (2012): pp. 166-172. DOI: 10.1016/j.micres.2011.05.005
11. Smirnova G.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Tyulenev A.V., Oktyabrsky O.N. Extracellular superoxide provokes glutathione efflux from *Escherichia coli* cells. *Research in Microbiology*. V. 166 (2015): pp. 609-617. DOI: 10.1016/j.resmic.2015.07.007
12. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*. V. 27 (1969): pp. 502-522. DOI: 10.1016/0003-2697(69)90064-5
13. Tyulenev A.V., Smirnova G.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Oktyabrsky O.N. The role of sulfides in stress-induced changes of Eh in *Escherichia coli* cultures. *Bioelectrochemistry*. V. 121 (2018): pp. 11-17. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2017.12.012

14. White A.P. et al. Intergenic sequence comparison of *Escherichia coli* isolates reveals lifestyle adaptations but not host specificity. *Applied Environmental Microbiology*. V. 77 (2011): pp. 7620-7632. DOI: 10.1128/AEM.05909-11

15. Wickens H.J., Pinney R.J., Mason D.J., Gant V.A. Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. V. 44. (2000): pp. 682-687. DOI: 10.1128/AAC.44.3.682-687.2000

16. Wilson I.D., Nicholson J.K. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Translational Research*. V. 179 (2017): pp. 204-222. DOI: 10.1016/j.trsl.2016.08.002

Статья поступила в редакцию 04.09.2023; одобрена после рецензирования 20.09.2023; принята к публикации 20.11.2023.

The article was submitted 04.09.2023; approved after reviewing 20.09.2023; accepted for publication 20.11.2023.

Информация об авторах

Галина Андреевна Триандафилова – lindick@ya.ru, инженер лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов; Алексей Валерьевич Тюленев – Leksey333@yandex.ru, к.б.н., ст. научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов;

Надежда Геннадьевна Музыка – к.б.н., ст. научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов;

Галина Васильевна Смирнова – smirnova@iegm.ru, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов;

Олег Николаевич Октябрьский – oktyabr@iegm.ru, проф., д.б.н., зав. лабораторией физиологии и генетики микроорганизмов.

Information about the authors

Galina A. Triandafilova – lindick@ya.ru, engineer in the Laboratory of physiology and genetics of microorganisms;

Aleksey V. Tyulenev – Leksey333@yandex.ru, candidate of biology, senior researcher in the Laboratory of physiology and genetics of microorganisms;

Nadezhda G. Muzyka – candidate of biology, senior researcher in the Laboratory of physiology and genetics of microorganisms;

Galina V. Smirnova – smirnova@iegm.ru, doctor of biology, leading researcher in Laboratory of physiology and genetics of microorganisms;

Oleg N. Oktyabrsky – oktyabr@iegm.ru, doctor of biology, professor, Head of the Laboratory of physiology and genetics of microorganisms.

Вклад авторов:

Триандафилова Г. А. – культивирование бактерий, определение ростовых параметров и внеклеточного глутатиона, обработка данных, оформление рисунков.

Тюленев В. А. – измерение концентрации кислорода и сульфида.

Музыка Н. Г. – измерение мембранного потенциала.

Смирнова Г. В. – анализ полученных данных.

Октябрьский О. Н. – общее руководство, написание текста.

Contribution of the authors:

Triandafilova G. A. – cultivation of bacteria, determination of growth parameters and extracellular glutathione, data processing, design of drawings.

Tyulenev V. A. – measurement of oxygen and sulfide concentrations.

Muzyka N. G. – measurement of membrane potential.

Smirnova G. V. – analysis of the obtained data.

Oktyabrsky O. N. – general guidance, text writing.

ГЕНЕТИКА

Научная статья

УДК 575.22

doi: 10.17072/1994-9952-2023-4-375-384.

Оценка состояния генофондов популяций *Pinus sylvestris* L. на востоке и северо-востоке Восточно-Европейской равнины

Яна Викторовна Сбоева

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия,
yana_prishnivskaya@mail.ru

Аннотация. Проведен молекулярно-генетический анализ хорологически смежных популяций *Pinus sylvestris* L. на востоке и северо-востоке Восточно-Европейской равнины с использованием межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК. Получены данные о генетическом разнообразии популяций и дана оценка состояния их генофондов. У изученных популяций сосны обыкновенной установлено высокое генетическое разнообразие ($P_{95} = 0.938$, $H_e = 0.170$, $n_e = 1.540$). Из 144 фрагментов ДНК только 3 (0.021%) являются редкими. Анализ доли редких аллелей показал, что генетическая структура менее сбалансирована в Верхневелужской ($h = 0.254$) и Велужско-Вятской ($h = 0.273$) популяциях. Наиболее сбалансированная генетическая структура отмечена в Моломской популяции ($h = 0.112$) и в Северо-Вятско-Увальской популяции ($h = 0.127$). При оценке состояния генофондов установлено, что наибольшие значения коэффициента генетической оригинальности (КГО) выявлены у популяций Сысоло-Вычегодской (1.164) и Волжско-Велужской (1.140), что свидетельствует о их высокой специфичности. Наименьшие значения КГО определены у популяций Велужско-Вятская (0.857) и Волжско-Суринская (0.875). Анализ всех трех групп показателей состояния генофондов популяций показал, что с учетом генетической структуры и генетической оригинальности у 6 популяций *P. sylvestris* состояние генофондов удовлетворительное, а двух популяций (Верхневелужская и Велужско-Вятская) отмечено обеднение генофондов. При отборе деревьев для сохранения и лесовосстановления необходимо выбирать популяции как с типичными, так с специфическими генофондами.

Ключевые слова: полиморфизм ДНК, генетическое разнообразие, генофонд популяций, *Pinus sylvestris* L., Восточно-Европейская равнина

Для цитирования: Сбоева Я. В. Оценка состояния генофондов популяций *Pinus sylvestris* L. на востоке и северо-востоке Восточно-Европейской равнины // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 4. С. 375–384. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-375-384>.

GENETICS

Original article

Assessment of the state of gene pools of *Pinus sylvestris* L. populations in the east and northeast of the East European Plain

Yana V. Sboeva

Perm State University, Perm, Russia, yana_prishnivskaya@mail.ru

Abstract. A molecular genetic analysis of horologically related populations of *Pinus sylvestris* L. was carried out. In the east and northeast of the East European Plain using intermicrosatellite analysis of DNA polymorphism. Data on the genetic diversity of populations were obtained and the state of their gene pools was assessed. The studied populations of Scots pine have a high genetic diversity ($P_{95} = 0.938$, $H_e = 0.170$, $n_e = 1.540$). Of the 144 DNA fragments, only 3 (0.021%) are rare. The analysis of the share of rare alleles showed that the genetic structure is less balanced in the populations of Verkhnevetluzhskaya ($h = 0.254$) and Vetluzhsko-Vyatka ($h = 0.273$). The most balanced genetic structure was observed in the Moloma population ($h = 0.112$) and in the North Vyatka-Uvala population ($h = 0.127$). When assessing the state of gene pools, it was found that the highest values of the coefficient of genetic originality (CSR) were found in the populations of Sysolo-Vychevodskaya (1.164) and Volga-Vetluzhskaya (1.140). This indicates the high specificity of the gene pools of these populations. The lowest values of CLO were determined in the Vetluzhsko-Vyatskaya (0.857) and Volzhsko-Surinskaya (0.875) populations. Analysis of all three groups of indicators of the state of gene pools of populations showed that, tak-

ing into account the genetic structure and genetic originality, 6 populations of *P. sylvestris* have a satisfactory state of gene pools, and two populations (Verkhnevetchuzhsкая and Vetchuzhsko-Vyatka) have depleted gene pools. When selecting trees for conservation and reforestation, it is necessary to preserve populations with both typical and specific gene pools.

Keywords: DNA polymorphism, genetic diversity, population gene pool, *Pinus sylvestris* L., East European Plain

For citation: Sboeva Ya. V. [Assessment of the state of gene pools of *Pinus sylvestris* L. populations in the east and northeast of the East European Plain]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2023): pp. 375-384. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-375-384>.

Введение

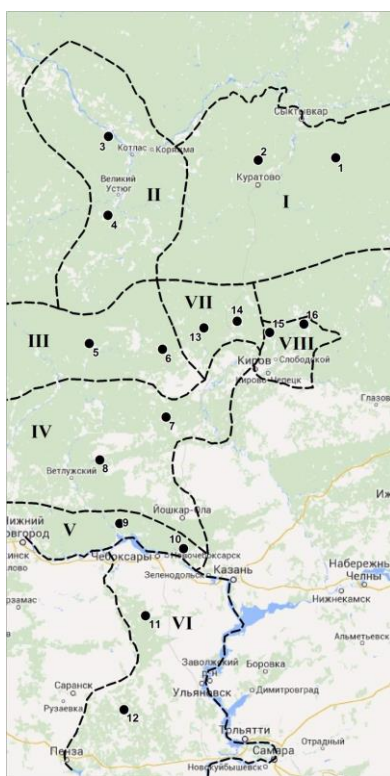
Сохранение генетических ресурсов лесобразующих видов растений предполагает изучение существующей структуры аборигенных популяций, т.е. уровней внутривидового генетического разнообразия и пространственного распределения характерной для вида генетической изменчивости [Алтухов, 2003; Макеева и др., 2018; Тараканов и др., 2019]. Важную роль при этом играет оценка состояния генофондов этих видов на популяционном уровне [Состояние ..., 2020; Тараканов и др., 2021]. Генофонды популяций оцениваются с использованием показателей их генетического разнообразия и с учетом внутривидовой дифференциации в регионе исследований [Degen et al., 2021; Янбаев и др., 2022]. Кроме этого, при оценке состояния генофондов необходимо учитывать генетическую структуру изучаемых популяций, а также специфику генофондов [Боронникова, 2013; Vasilyeva et al., 2021]. Именно на данных о генетической структуре и состоянии генофондов популяций обосновывается комплекс мероприятий, направленных на максимальное сохранение генетического разнообразия вида в процессе долгосрочного неистощительного природопользования и воспроизводства лесов [Динамика ..., 2004; Крутовский, 2014; Рябухина и др., 2019]. Известно, что при сокращении эффективной численности древесных растений в популяциях из-за сплошных рубок, потери древостоев в результате пожаров, болезней, ветровала, загрязнения окружающей среды, происходит неуклонное снижение генетического разнообразия [Видякин, 2004а; Konig, Geburek, Turok, 2005; Захарова, Сейц, 2017; Yanbaev et al., 2020; Шейкина, Гладков, 2020]. Вырубка лесов, особенно несанкционированная, уничтожает некоторые генотипы и неизбежно приводит к генетическому обеднению популяций и уменьшению генетического разнообразия [Ветчинникова и др., 2013; Шилкина и др., 2019].

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L. *Pinaceae*) имеет один из наиболее обширных ареалов среди всех хвойных древесных видов мира, растет в широком диапазоне экологических условий [Состояние ..., 2020; Vasilyeva et al., 2021]. Популяционно-хорологическая структура сосны обыкновенной характеризуется специфическими и относительно стабильными частотами генотипически детерминированных морфологических признаков-маркеров разного ранга [Видякин, 2010]. Исследования А.И. Видякина [2004а, б] показали, что маркерными характеристиками популяций сосны обыкновенной являются различные показатели шишек, отражающие форму органов или пропорции их частей. Согласно результатам его исследований, среди количественных характеристик генеративных органов популяционными маркерами могут считаться только показатели шишек, семян и семенных крылышек [Видякин, 2004а, б]. Выделение 8 хорологически смежных популяций *P. sylvestris* на востоке и северо-востоке Восточно-Европейской равнины на основании морфофенотипических данных шишек [Видякин, 2004] подтверждено с использованием молекулярно-генетических методов [Видякин и др., 2015].

В настоящее время применяются разные подходы к оценке состояния генофондов [Сидор и др., 2014; Ильинов, Раевский, 2015; Гермак, Калько, 2019; Сбоева, Боронникова, 2019; Ильинов, Раевский, Чирва, 2020], в том числе для видов хвойных растений [Нечаева, 2015]. Вместе с тем, пространственное распределение генетической изменчивости [Гладков, Шейкина, Швецова, 2016; Шейкина, Гладков, Демаков, 2017] и оценка состояния генофондов популяций *P. sylvestris* не исследованы в полной мере на востоке и северо-востоке Восточно-Европейской равнины.

Материал и методы исследования

Объектами исследования явились 8 хорологически смежных популяций *P. sylvestris* на востоке восточно-Европейской равнины: I – Сысоло-Вычегодская, II – Северодвинская, III – Верхневетлужская, IV – Ветлужско-Вятская, V – Волжско-Ветлужская, VI – Волжско-Суринаская, VII – Велико-Моломская, VIII – Летско-Холуницкая. Эти популяции были выделены ранее на основании морфофенотипических данных шишек [Видякин, 2004а, б]: в каждой популяции изучены по 2 выборки, поэтому были обследованы 16 выборок (рисунок). Весной 2012–2015 гг. были собраны свежие вегетативные почки латеральных побегов индивидуально с 46 деревьев каждой выборки, расположенных на расстоянии не менее 100 м друг от друга. Общая выборка составила 736 деревьев. Материалом для молекулярно-генетических исследований служила хвоя из распутившихся почек.



Карта-схема расположения популяций *P. sylvestris* и мест отбора популяционных выборок для молекулярно-генетического анализа.

Популяции: I – Сысоло-Вычегодская, II – Северодвинская, III – Верхневетлужская, IV – Ветлужско-Вятская, V – Волжско-Ветлужская, VI – Волжско-Суринская, VII – Моломская, VIII – Северо-Вятско-Увальская;
 ---- границы популяций; ● 5 – место отбора и номер популяционной выборки

[Schematic map of the location of *P. sylvestris* populations and places of selection of population samples for molecular genetic analysis.

Populations: I – Sysolo-Vycheгда, II – Severodvinsk, III – Verkhnevetluzhskaya, IV – Vetluzhsko-Vyatluzhskaya, V – Volzhsko-Vetluzhskaya, VI – Volzhsko-Surinskaya, VII – Molomskaya, VIII – North-Vyatsko-Uvalskaya;
 ----population boundary; ● 5 – sampling location and population sample number]

Анализ полиморфизма ДНК проведен у 736 проб ДНК *P. sylvestris*. Проанализирован полиморфизм 144 фрагментов ДНК, т.е. матрица содержала 105 984 позиции. Для молекулярно-генетического анализа применялся ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)-метод анализа полиморфизма ДНК [Zietkiewicz, Rafalski, Labuda, 1994]. Эффективные праймеры для *P. sylvestris* были определены ранее [Нечаева и др., 2014]. Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) объемом 25 мкл использовалась реакционная смесь, содержащая: 2 единицы Taq-полимеразы, 2.5 мкл стандартного 10x буфера для ПЦР, 25 пМ праймера; 2.5 mM MgCl, 0.25 mM dNTP, 5 мкл тотальной ДНК. Амплификацию проводили в амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 («Applied Biosystems», USA) по следующей программе: предварительная денатурация 94°C, 2 мин.; первые пять циклов: 94°C, 20 сек.; t° отжига праймера, 10 сек.; 72°C, 10 сек.; в последующих тридцати пяти циклах 94°C, 5 сек.; t° отж., 5 сек.; 72°C, 5 сек. Последний цикл элонгации длился 2 мин. при t° 72°C. Температура отжига в зависимости от G/C-состава праймеров варьировала от 46 до 64°C. Для проверки достоверности, полученных ДНК-спектров, ПЦР и электрофорез повторяли не менее трех раз. В качестве отрицательного (К-) контроля в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК добавляли 5 мкл деионизированной воды. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1.7%-ном агарозном геле в 1xTBEбуфере, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете в системе Gel Doc XR (Bio Rad, USA). Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 bp + 1.5 + 3 Kb DNA Ladder, ООО СибЭнзимМ, Москва). Определение длин фрагментов проводилось с использованием программы Quantity One в системе геледокументации Gel-Doc XR (Bio-Rad, USA). В изученных популяциях *P. sylvestris* проанализирован полиморфизм 114 ДНК-фрагментов.

Компьютерный анализ данных проведен по стандартным для молекулярно-генетического анализа программам [Yeh, Yang, Boyle, 1999; Peakall, Smouse, 2006]. Уровень внутрипопуляционного разнообразия оценивался с помощью показателей: среднее число морф (μ) и доля редких морф (h) [Животовский, 1980]. Выявление специфических особенностей генофондов проводилось с использованием метода рас-

чета коэффициента генетической оригинальности (КГО) [Потокина, Александрова, 2008], модифицированной для дикорастущих древесных видов растений [Боронникова, 2013]. Оценка состояния генофондов популяций сосны обыкновенной проведена в соответствии с методикой С.В. Боронниковой [2013].

Сравнение долей полиморфных локусов и показателей ожидаемой гетерозиготности проведены по критерию Фишера с преобразованием ϕ [Урбах, 1963]. Определение параметров генетического разнообразия популяций проводилось с использованием программы STATISTICA 12.0.

Результаты и их обсуждение

Изучение генофондов лесобразующих видов растений с использованием молекулярных маркеров основано на оценках количественных характеристик генетического разнообразия популяций. Одной из них является доля полиморфных локусов (P_{95}), которая выше в популяции VII ($P_{95}=0.862$), а ниже – в IV ($P_{95}=0.512$). Средняя ожидаемая гетерозиготность (H_E) на общую популяцию *P. sylvestris* составила 0.170. Этот показатель наибольший в популяции VII ($H_E = 0.238$), а наименьший – в популяции IV ($H_E = 0.085$) (табл. 1). Абсолютное число аллелей на локус (n_a), а в данном случае на фрагмент ДНК на общую популяцию, составило 1.972. Этот параметр наивысший в популяции VIII, в популяции IV он наименьший (табл. 1). Эффективное число аллелей на локус (n_e) на общую выборку равно 1.540. Наибольшее значение этого показателя в популяции VII ($n_e = 1.405$), а наименьшее – в популяции III ($n_e = 1.132$). Информационный Индекс Шеннона выше в популяции VIII ($I = 0.358$), ниже – в популяции IV (табл. 1).

Таблица 1

Генетическое разнообразие изученных восьми популяций *P. sylvestris*
[Genetic diversity of the eight *P. sylvestris* populations studied]

Популяции	P_{95}	H_E	n_a	n_e	I	R
I	0.742	0.167 (0.016)	1.507 (0.075)	1.279 (0.029)	0.254 (0.023)	0
II	0.760	0.164 (0.015)	1.528 (0.076)	1.268 (0.028)	0.252 (0.022)	0
III	0.561	0.106 (0.014)	1.333 (0.073)	1.178 (0.026)	0.160 (0.021)	0
IV	0.512	0.085 (0.012)	1.313 (0.071)	1.132 (0.021)	0.134 (0.018)	1 (0.007)
V	0.741	0.175 (0.017)	1.472 (0.078)	1.300 (0.031)	0.260 (0.024)	0
VI	0.765	0.187 (0.016)	1.569 (0.076)	1.318 (0.031)	0.282 (0.023)	2 (0.014)
VII	0.862	0.238 (0.016)	1.660 (0.071)	1.405 (0.031)	0.356 (0.023)	0
VIII	0.839	0.237 (0.016)	1.708 (0.070)	1.400 (0.030)	0.358 (0.023)	0
На общую выборку	0.938	0.170 (0.006)	1.972 (0.027)	1.540 (0.010)	0.257 (0.008)	3 (0.021)

Примечание: H_E – ожидаемая гетерозиготность; n_a – абсолютное число аллелей на локус; n_e – эффективное число аллелей на локус; I – информационный индекс Шеннона; у всех вышеуказанных параметров в скобках даны стандартные отклонения; R – число редких фрагментов, в скобках указана их доля от общего числа фрагментов.

У популяций, произрастающих на правом берегу р. Волги в северной и центральной части Приволжской возвышенности, с использованием ISSR-метода выявления полиморфизма ДНК установлено [Шейкина, 2022], что ожидаемая гетерозиготность (H_E) варьирует от 0.217 до 0.241, а эффективное число аллелей (n_e) – от 1.34 до 1.39; у левобережных популяций диапазон варьирования показателей уже ($n_e = 1.27–1.35$; $H_E = 0.174–0.218$).

Из 144 ДНК-фрагментов 3 (0.02%) являются редкими (R), т.е. встречающиеся с частотой менее 5%, а 141 ДНК-фрагментов (99.98%) являются общими для всех изученных популяций. С помощью ISSR-метода выявления полиморфизма ДНК в VI выявлено 2 уникальных фрагмента, т.е. характерных только для этой популяции. В популяции IV выявлен 1 уникальный фрагмент, а в остальных шести популяциях уникальных фрагментов не обнаружено (табл. 1).

Таким образом, установлено, что общая выборка из восьми популяций *P. sylvestris* на Восточно-Европейской равнине характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия ($P_{95}=0.938$; $H_E = 0.170$; $n_e = 1.540$), при этом наибольшие значения изученных параметров отмечены в Моломской (VII) популяции ($P_{95}=0.862$; $H_E = 0.238$; $n_e = 1.405$), а наименьшие – в Ветлужско-Вятской (IV) ($P_{95}=0.512$; $H_E = 0.085$; $n_e = 1.132$). Разница между показателями доли полиморфных локусов ($F = 7.535$) и ожидаемой гетерозиготности ($F = 4.101$) между популяциями VII и IV значима ($F_{\text{опыт}} > 1.96$). Тем не менее, ожидаемая гетерозиготность и эффективное число аллелей, в изученных популяциях *P. sylvestris* незначительно ниже, чем в популяциях этого вида в северной и центральной частях Приволжской возвышенности.

Для оценки состояния генофондов популяций сосны обыкновенной параметры генетического разнообразия разделены на три группы (табл. 2). К первой группе «Основные показатели генетического разнообразия» относятся доля полиморфных локусов (P_{95}) и ожидаемая гетерозиготность (H_E). Вторая группа «Генетическая структура и дифференциация популяций» включает показатели внутрипопуляционного

разнообразия (μ), и долю редких фрагментов ДНК (h), информационный индекс Шеннона (I). Третья группа «Специфика генофондов» содержит показатели: число редких аллелей (R) и КГО.

Таблица 2

Расчет коэффициента генетической оригинальности (КГО) 8 популяций *P. sylvestris*
[Calculation of the coefficient of genetic originality (GCO) of 8 populations of *P. sylvestris*]

Исходная матрица присутствия/отсутствия ISSR-фрагментов в 8 выборках					«Взвешанные» на основе частоты встречаемости в выборке значения присутствия/отсутствия ISSR-фрагментов					Σ	КГО= Σ/N
Поп.	IS1_1350	IS1_1130	IS1_930	n	Поп.	IS1_1350	IS1_1130	IS1_930	n		
I	0	1	0	...	I	0.33	3	0.17	...	142.35	1.164
II	0	0	0	...	II	0.33	0.33	0.17	...	118.85	0.981
III	0	0	0	...	III	0.33	0.33	0.17	...	148.03	0.932
IV	0	0	0	...	IV	0.33	0.33	0.17	...	132.84	0.857
V	0	0	0	...	V	0.33	0.33	0.17	...	138.62	1.140
VI	0	0	0	...	VI	0.33	0.33	0.17	...	119.47	0.875
VII	1	0	1	...	VII	3	0.33	6	...	130.16	1.033
VIII	1	1	0	...	VIII	3	3	0.17	...	159.27	1.019
Кол-во «1»	2	2	1	...	Кол-во «1»	2	2	1	...		
Кол-во «0»	6	6	6	...	Кол-во «0»	6	6	6	...		
«Вес» «1»	3	3	6	...	«Вес» «1»	3	3	6	...		
«Вес» «0»	0.33	0.33	0.17	...	«Вес» «0»	0.33	0.33	0.17	...		

Примечание: Σ – сумма «весов» всех ISSR-фрагментов для каждой популяции, КГО= Σ/N – коэффициент генетической оригинальности популяции как частное полученной суммы и количества проанализированных ISSR-фрагментов каждой популяции ($n = 125$).

Полученные показатели оценки состояния приведены в табл. 3. При анализе внутривидового разнообразия *P. sylvestris* с применением показателя μ , предложенного Л.А. Животовским [1980], установлено, что у изученных популяций более равномерно распределены частоты аллелей в популяциях VII ($\mu = 1.776$) и VIII ($\mu = 1.747$), а менее ($\mu = 1.454$) – у популяции IV (табл. 3). Показатель h позволяет характеризовать структуру разнообразия каждой популяции. По мнению Л.А. Животовского [1980], при значениях $h > 0.3$ в генетической структуре популяций увеличена доля рецессивных гомозигот. Таким образом, чем меньше значения h порогового 0.3, тем более сбалансированной структурой разнообразия характеризуются изученные популяции. Все изученные популяции *P. sylvestris* на Восточно-Европейской равнине в той или иной степени сбалансированы. Наиболее сбалансирована генетическая структура в популяциях VII ($h=0.112$) и VIII ($h=0.127$), менее сбалансированными являются популяции III ($h=0.254$) и IV ($h=0.273$).

Таблица 3

Оценка состояния популяционных генофондов *P. sylvestris*
[Assessment of the state of *P. sylvestris* population gene pools]

Популяция	I. Основные показатели генетического разнообразия		II. Генетическая структура и дифференциация популяций			III. Специфика генофондов		Оценка состояния генофондов	
	P_{95}	H_E	μ	h	I	R	КГО	тип	состояние
I	0.742	0.167	1.653	0.173	0.254	0	1.164	C	I
II	0.760	0.164	1.680	0.160	0.252	0	0.981		I
III	0.561	0.106	1.492	0.254	0.160	0	0.932	T	II
IV	0.512	0.085	1.454	0.273	0.134	1	0.857	T	II
V	0.741	0.175	1.659	0.171	0.260	0	1.140	C	I
VI	0.765	0.187	1.663	0.168	0.282	2	0.875	T	I
VII	0.862	0.238	1.776	0.112	0.356	0	1.033		I
VIII	0.829	0.237	1.747	0.127	0.358	0	1.019		I

Примечание: P_{95} – доля полиморфных локусов; H_E – ожидаемая гетерозиготность; μ – среднее число морф; h – доля редких морф; I – информационный индекс Шеннона; R – число уникальных фрагментов; КГО – коэффициент генетической оригинальности; типы генофондов: T – типичный генофонд, C – специфичный генофонд; I – состояние удовлетворительное, II – состояние обеднение генофонда.

Наибольшее значение индекса Шенона (I) выявлено в популяции VIII (0.358), а наименьшее, равное 0.134, у популяции IV.

Наибольшее значение КГО установлено у Сысоло-Вычегодской (I) (КГО =1.164) и у Волжско-Ветлужской (V) популяций (КГО =1.140), что позволяет судить о высокой специфичности генофондов этих популяций для региона исследований. Наименьшее значение КГО наблюдается в IV (КГО =0.857) и VI (КГО =0.875) популяциях. Они характеризуются типичным генофондом (табл. 3), т.е. содержат типичные для региона исследований аллели. Наибольшие показатели генетического разнообразия в первой и во второй группах параметров установлены в популяции VII, а наименьшие – в популяции IV (табл. 3). С целью сохранения генофондов ресурсных видов растений и объективной оценки генетических взаимосвязей между генофондами рекомендуется отбор как популяций с типовыми генофондами, так и популяций со специфическими особенностями генофондов [Боронникова, 2013], являющихся резервом генетической изменчивости. Анализ всех трех групп показателей состояния генофондов популяций показал, что с учетом генетической структуры и генетической оригинальности у 6 популяций *P. sylvestris* состояние удовлетворительное, а у двух популяций (III и IV) отмечено обеднение генофондов.

С целью сохранения генофонда ценного ресурсного вида растений *P. sylvestris* рекомендуется отбирать как популяции с типичными генофондами, так и популяции, обладающие специфическими особенностями генофондов, являющиеся резервом генетической изменчивости. Для лесовосстановления нужно не только сохранять генофонды популяций, но и генетическую структуру популяций с учетом внутри- и межпопуляционной дифференциации, что будет способствовать сохранению генетического разнообразия лесообразующих видов растений.

Заключение

В ходе молекулярно-генетического анализа с использованием ISSR-метода анализа полиморфизма ДНК установлено, что изученные на Восточно-Европейской равнине восемь популяций *P. sylvestris* характеризуется высокими показателями генетического разнообразия ($P_{95} = 0.938$; $H_E = 0.170$; $n_e = 1.540$). Среди 8 изученных популяций наибольшее генетическое разнообразие характерно для Велико-Моломской (VII) популяции ($P_{95} = 0.862$; $H_E = 0.238$; $n_e = 1.405$), а наименьшее – для Ветлужско-Вятской (IV) популяции ($P_{95} = 0.512$; $H_E = 0.085$; $n_e = 1.132$). У всех изученных популяций показатель h (доля редких аллелей для оценки состояния генетической структуры популяций) имеет значения, меньшие 0.3. Вместе с тем, генетическая структура менее сбалансирована в Верхневетлужской (III) ($h = 0.254$) и Ветлужско-Вятской (IV) популяциях ($h = 0.273$), а наиболее сбалансирована – в Велико-Моломской (VII) ($h = 0.112$) и Северо-Вятско-Увальской (VIII) популяциях ($h = 0.127$). При оценке состояния генофондов было установлено, что наибольшее значение КГО определено в популяциях Велико-Моломской (1.164) и Волжско-Ветлужской (1.140), что позволяет судить о высокой специфичности генофондов данных популяций. Наименьшее значение КГО наблюдается у популяций Ветлужско-Вятской (0.857) и Волжско-Суринской (0.875). Эти популяции характеризуются типичными генофондами, т.е. содержат аллели, характерные для исследуемого региона. Было установлено, что генофонды шести популяций находятся в удовлетворительном состоянии (I, II, V, VI, VII и VIII), а у популяций III и IV наблюдается обеднение генофонда. Для сохранения генофондов на популяционном уровне рекомендуются популяции Ветлужско-Вятская (IV) и Волжско-Суринская (VI) с типичным генофондом, а также популяции Северодвинская (II) и Волжско-Ветлужская (V) – со специфическими генофондами.

Список источников

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях / отв. ред. Л.А. Животовский. М.: Академкнига, 2003. 431 с.
2. Боронникова С.В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края. Пермь, 2013. 223 с.
3. Ветчинникова Л.В., Титов А.Ф., Кузнецова Т.Ю. Карельская береза: биологические особенности, динамика ресурсов и воспроизводство. Петрозаводск, 2013. 312 с.
4. Видякин А.И. Изменчивость количества семян сосны обыкновенной производственной и опытной заготовки на Северо-Востоке Русской равнины // Теоретическая и прикладная экология. 2010. № 3. С. 90–95.
5. Видякин А.И. Популяционная структура сосны обыкновенной на востоке европейской части России: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Екатеринбург, 2004а. 48 с.
6. Видякин А.И. Изучение популяционной структуры сосны обыкновенной на основе индексной оценки признаков генеративных органов // Методы популяционной биологии: сб. материалов. VII Всерос. популяц. семинара. Сыктывкар, 2004б. Ч. 1. С. 35–37.

7. Видякин А.И. и др. Генетическая изменчивость, структура и дифференциация популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на северо-востоке Русской равнины по данным молекулярно-генетического анализа // Генетика. 2015. Т. 51, № 12. С. 1401–1409.
8. Гермак М.В., Калько Г.В. Микросателлитный анализ для оценки дифференциации популяций ели европейской на Северо-западе России // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. 2019. № 1. С. 4–14.
9. Гладков Ю.Ф., Шейкина О.В., Швецова Е.Н. Сравнение частот встречаемости ISSR-ДНК-маркеров в смежных болотной и суходольной ценопопуляциях сосны обыкновенной в республике Марий Эл // Современные проблемы медицины и естественных наук: сб. статей Междунар. науч. конф. Йошкар-Ола, 2016. Вып. 5. С. 139–143.
10. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю.П. Алтухова. М.: Наука, 2004. 619 с.
11. Животовский Л.А. Показатель внутривидового разнообразия // Журнал общей биологии. 1980. Т. 41, № 6. С. 828–836.
12. Захарова К.В., Сейц К.С. Роль экологических факторов в формировании генетической структуры популяций *P. abies* (L.) Karst. // Экологическая генетика. 2017. Т. 15, № 2. С. 11–20.
13. Ильинов А.А., Раевский Б.В. Сравнительная оценка генетического разнообразия естественных популяций и клоновых плантаций сосны обыкновенной и ели финской в Карелии // Экологическая генетика. 2015. Т. 13, № 4. С. 55–67.
14. Ильинов А.А., Раевский Б.В., Чирва О.В. Состояние генофондов основных лесобразующих видов водосбора Белого моря (на примере *Picea × fennica* (Regel) Kom. и *Pinus sylvestris* L.) // Экологическая генетика. 2020. Т. 18, № 2. С. 185–202.
15. Крутовский К.В. Перспективы использования геномных исследований в лесном хозяйстве // Сибирский лесной журнал. 2014. № 4. С. 11–15.
16. Лесной план Кировской области на 2008-2020 годы [Электронный ресурс]. URL: www.kirovreg.ru/publ/akoпр.nsf/ (дата обращения: 29.10.2023).
17. Макеева В.М. и др. Оценка состояния генофонда и жизнеспособности лесопосадок ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) из парков города Москвы и Подмосковья // Леса России: политика, промышленность, наука, образование: материалы третьей междунар. науч.-техн. конф. СПб., 2018. С. 187–190.
18. Нечаева Ю.С. Молекулярно-генетический анализ природных популяций западной расы *Larix sibirica* Ledeb. (*Larix sukaczewii* Dyl.) на Среднем и Северном Урале: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2015. 25 с.
19. Нечаева Ю.С. и др. Молекулярно-генетический анализ популяций хвойных видов растений на Урале и востоке европейской части России для сохранения и возобновления лесных ресурсов // Известия Самарского научного центра РАН. 2014. Т. 16, № 1(3). С. 878–882.
20. Потокина Е.К., Александрова Т.Г. Методы классификации внутривидового разнообразия по результатам молекулярного маркирования // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: материалы Всерос. конф. Петрозаводск, 2008. Ч. 3. С. 62–65.
21. Рябухина М.В. и др. Генетическое разнообразие популяций сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. // Теоретическая и прикладная экология. 2019. № 3. С. 66–71.
22. Сбоева Я.В., Боронникова С.В. Генетическая структура и межпопуляционная дифференциация восьми популяций *Pinus sylvestris* L. на Восточно-Европейской равнине // Бюллетень науки и практики. 2019. Т. 5, № 12. С. 89–97. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/49/10>.
23. Сидор А.И. и др. Селекционная и генетическая оценка лесосеменных плантаций дуба черешчатого ГЛХУ «Кличевский лесхоз» // Труды БГТУ. 2014. № 1. С. 181–184.
24. Состояние лесных генетических ресурсов Российской Федерации: 2-й Национальный доклад Российской Федерации / под общ. ред. М.М. Паленовой. М.: ВНИИЛМ, 2020. 213 с.
25. Тараканов В.В. и др. Состояние и перспективы развития генетико-селекционного комплекса хвойных пород в Сибири (на примере Новосибирской области) // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер. Лес. Экология. Природопользование. 2019. № 3 (43). С. 5–24.
26. Тараканов В.В. и др. Лесная селекция в России: достижения, проблемы, приоритеты (обзор) // Лесохозяйственная информация. 2021. № 1. С. 100–143.
27. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. М.: Изд-во АН СССР, 1963. Т. 1. 323 с.
28. Шейкина О.В. Генетическая структура и дифференциация популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Среднем и Верхнем Поволжье // Экологическая генетика. 2022. Т. 20, № 4. С. 261–270.
29. Шейкина О.В., Гладков Ю.Ф. Генетическое разнообразие и дифференциация ценопопуляций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), сформированных в болотных и суходольных экотопах // Биология. 2020. № 50. С. 101–118.

30. Шейкина О.В., Гладков Ю.Ф., Демаков Ю.П. Генетическая структура суходольных и болотных ценопопуляций сосны обыкновенной в республике Марий Эл // Проблемы популяционной биологии: Материалы XII Всерос. популяционного семинара. Йошкар-Ола, 2017. С. 262–265.
31. Шилкина Е.А. и др. Использование методов ДНК-анализа в экспертизе незаконного оборота древесины // Сибирский лесной журнал. 2019. № 3. С. 64–70.
32. Янбаев Р.Ю. и др. Анализ взаимосвязи климатических факторов и генетического разнообразия популяций дуба черешчатого в разных частях Республики Башкортостан // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2022. Вып. 4. С. 327–334.
33. Degen B. et al. Applying targeted genotyping by sequencing with a new set of nuclear and plastid SNP and indel loci for *Quercus robur* and *Quercus petraea* // Conservation Genetics Resources. 2021. Vol. 13 (4). P. 345–347.
34. Konig A.O., Geburek Th., Turok J. Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe // Arbora Publishers. 2005. P. 281–284.
35. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Not. 2006. Vol. 6. P. 288–295.
36. Vasilyeva Yu. et al. Genetic Structure, Differentiation and Originality of *Pinus sylvestris* L. Populations in the East of the East European Plain // Forests. 2021. Vol. 12. P. 999.
37. Yanbaev Yu. et al. Gene pool of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) under reforestation in extreme environment // Wood Res. 2020. № 65. P. 459–470.
38. Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T. POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits / Department of Renewable Resources, Univ. of Alberta, Edmonton. Alta, 1999. 238 p.
39. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. Vol. 20, № 2. P. 176–183.

References

1. Altuxov Yu.P. *Genetičeskie processy v populacijach* [Genetic processes in populations]. ed. L.A. Zhivotovskij. Moscow, Akademkniga Publ., 2003. 431 p. (In Russ.).
2. Boronnikova S.V. *Molekuljarno-genetičeskij analiz i ocenka sostojanija genofondov resursnyh vidov rastenij Permskogo kraja* [Molecular genetic analysis and assessment of the state of gene pools of resource plant species of the Perm Region]. Perm, 2013. 223 p. (In Russ.).
3. Vetchinnikova L.V., Titov A.F., Kuznecova T.Yu. *Karel'skaja bereza: biologičeskie osobennosti, dinamika resursov i vosproizvodstvo* [Karelian birch: biological features, resource dynamics and reproduction]. Petrozavodsk, 2013. 312 p. (In Russ.).
4. Vidyakin A.I. [Variability of the number of cotyledons in the seeds of the common pine of industrial and experimental harvesting in the North-East of the Russian plain]. *Teoretičeskaja i prikladnaja ekologija*. No. 3 (2010): pp. 90-95. (In Russ.).
5. Vidyakin A.I. *Populjacionnaja struktura sosny obyknovenoj na vostoке evropejskoj časti Rossii: avtoref. dis. d-ra biol. nauk* [The population structure of Scots pine in the east of the European part of Russia. Abstract Diss.]. Ekaterinburg, 2004a. 48 p. (In Russ.).
6. Vidyakin A.I. [The study of the population structure of Scots pine based on an index assessment of the characteristics of generative organs]. *Metody populjacionnoj biologii* [Methods of population biology. Collection of materials. VII All-Russian Population Seminar]. Syktyvkar, 2004b, Part 1, pp. 35-37. (In Russ.).
7. Vidyakin A.I., Boronnikova S.V., Nechaeva Yu.S., Prishnivskaya Ya.V., Boboshina I.V. [Genetic variability, structure and differentiation of populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the north-east of the Russian Plain according to molecular genetic analysis]. *Genetika*. V. 51, No. 12 (2015): pp. 1401-1409. (In Russ.).
8. Germak M.V., Kal'ko G.V. [Microsatellite analysis to assess the differentiation of European spruce populations in Northwestern Russia]. *Trudy Sankt-Peterburgskogo naučno-issledovatel'skogo instituta lesnogo chozjajstva*. No. 1 (2019): pp. 4-14. (In Russ.).
9. Gladkov Yu.F., Shejkina O.V., Shveczova E.N. [Comparison of the frequency of occurrence of ISSR-DNA markers in adjacent swamp and dryland populations of Scots pine in the Republic of Mari El]. *Sovremennye problemy mediciny i estestvennyh nauk* [Modern problems of medicine and natural sciences. Collection of articles of the International Scientific Conference]. Yoshkar-Ola, 2016, pp. 139-143. (In Russ.).
10. Altuxov Yu.P., ed. *Dinamika populjacionnyh genofondov pri antropogennyh vozdeystvijach* [Dynamics of population gene pools under anthropogenic influences]. Moscow, Nauka Publ., 2004. 619 p. (In Russ.).
11. Zhivotovskij L.A. [Indicator of intrapopulation diversity]. *Žurnal obščej biologii*. V. 41, No. 6 (1980): pp. 828-836. (In Russ.).
12. Zaharova K.V., Sejcz K.S [The role of environmental factors in the formation of the genetic structure of *P. abies* (L.) Karst. populations]. *Ėkologičeskaja genetika*. V. 15, No. 2 (2017): pp. 11-20. (In Russ.).

13. Il'inov A.A., Raevskij B.V. [Comparative assessment of the genetic diversity of natural populations and clone plantations of Scots pine and Finnish spruce in Karelia]. *Ėkologičeskaja genetika*. V. 13, No. 4 (2015): pp. 55-67. (In Russ.).
14. Il'inov A.A., Raevskij B.V., Chirva O.V. [The state of the gene pools of the main forest-forming species of the White Sea catchment (using the example of *Picea fennica* (Regel) Kom. and *Pinus sylvestris* L.)]. *Ėkologičeskaja genetika*. V. 18, No. 2 (2020): pp. 185-202. (In Russ.).
15. Krutovskij K.V. [Prospects for the use of genomic research in forestry]. *Sibirskij lesnoj žurnal*. No. 4 (2014): pp. 11-15. (In Russ.).
16. *Lesnoj plan Kirovskoj oblasti na 2008-2020 gody* [Forest plan of the Kirov region for 2008-2020]. Available at: www.kirovreg.ru/publ/akoup.nsf/ (accessed 29.10.2023). (In Russ.).
17. Makeeva V.M., Smurov A.V., Politov D.V., Belokon` M.M., Belokon` Yu.S., Suslova E.G. [Assessment of the state of the gene pool and viability of European spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) plantations from parks in Moscow and the Moscow region]. *Lesa Rossii: politika, promyšlennost`, nauka, obrazovanie* [Forests of Russia: politics, industry, science, education: materials of the Third International Scientific and Technical Conference]. St-Peterburg, 2018, pp. 187-190. (In Russ.).
18. Nechaeva Yu.S. *Molekuljarno-genetičeskij analiz prirodnyh populacij zapadnoj rasy Larix sibirica Ledeb. (Larix sukacewii Dyl.) na Srednem i Severnom Urale: avtoref. dis. kand. biol. nauk* [Molecular genetic analysis of natural populations of the Western race *Larix sibirica* Ledeb. (*Larix sukacewii* Dyl.) in the Middle and Northern Urals. Abstract Cand. Diss.]. Ufa, 2015. 25 p. (In Russ.).
19. Nechaeva Yu.S., Boronnikova S.V., Vidyakin A.I., Prishnivskaya Ya.V., Yusupov R.R. [Molecular genetic analysis of populations of coniferous plant species in the Urals and the east of the European part of Russia for the conservation and renewal of forest resources]. *Izvestija Samarskogo naučnogo centra RAN*. V. 16, No. 1(3) (2014): pp. 878-882. (In Russ.).
20. Potokina E.K., Aleksandrova T.G. [Methods of classification of intraspecific diversity based on the results of molecular labeling]. *Fundamental`nye i prikladnye problemy botaniki v načale XXI veka* [Fundamental and applied problems of botany at the beginning of the XXI century: materials of the All-Russian Conference]. Petrozavodsk, 2008, Part 3, pp. 62-65. (In Russ.).
21. Ryabuxina M.V., Kalyakina R.G., Ryabinina Z.N., Majskij R.A. [The genetic diversity of populations of scots pine *Pinus sylvestris* L.]. *Teoretičeskaja i prikladnaja ėkologija*. No. 3 (2019): pp. 66-71. (In Russ.).
22. Sboeva Ya.V., Boronnikova S.V. [Genetic structure and inter-population differentiation of eight populations of *Pinus sylvestris* L. on the East European Plain]. *Bjulleten` nauki i praktiki*. V. 5, No.12 (2019): pp. 89-97. (In Russ.). <https://doi.org/10.33619/2414-2948/49/10>.
23. Sidor A.I., Revyako I.D., Kagan D.I., Kovalevich O.A., Selix O.V. [Breeding and genetic assessment of the seed plantations of the petiolate oak GLHU "Klichevsky forestry"]. *Trudy BGTU*. No. 1 (2014): pp. 181-184. (In Russ.).
24. Palenova M.M., ed. *Sostoyanie lesnyh genetičeskich resursov Rossijskoj Federacii* [The state of forest genetic resources of the Russian Federation: the 2nd National Report of the Russian Federation]. Moscow, VNIILM Publ., 2020. 213 p. (In Russ.).
25. Tarakanov V.V., Dubovik D.S., Rogovcev R.V., Zacepina K.G., Bugakov A.V., Goncharova T.V. [The state and prospects of the development of the genetic and breeding complex of coniferous species in Siberia (on the example of the Novosibirsk region)]. *Vestnik Povolžskogo gosudarstvennogo tehnologičeskogo univertsiteta. Ser.: Les. Ėkologija. Prirodopol`zovanie*. No. 3 (43) (2019): pp. 5-24. (In Russ.).
26. Tarakanov V.V., Palenova M.M., Parkina O.V., Rogovcev R.V., Tret'yakova R.A. [Forest breeding in Russia: achievements, challenges, priorities (overview)]. *Lesochozjajstvennaja informacija*. No. 1 (2021): pp. 100-143. (In Russ.).
27. Urbax V.Yu. *Matematičeskaja statistika dlja biologov i medikov* [Mathematical statistics for biologists and doctors]. Moscow, AN SSSR Publ., 1963, V. 1. 323 p. (In Russ.).
28. Shejkina O.V. [Genetic structure and differentiation of populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the Middle and Upper Volga region]. *Ėkologičeskaja genetika*. V. 20, No. 4 (2022): pp. 261-270. (In Russ.).
29. Shejkina O.V., Gladkov Yu.F. [Genetic diversity and differentiation of cenopopulations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) formed in swamp and dryland ecotopes]. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologija*. No. 50 (2020): pp. 101-118. (In Russ.).
30. Shejkina O.V., Gladkov Yu.F., Demakov Yu.P. [The genetic structure of dryland and marsh cenopopulations of Scots pine in the Republic of Mari El]. *Problemy populjacionnoj biologii* [Problems of population biology. Materials of the XII All-Russian Population Seminar]. Joshkar-Ola, 2017, pp. 262-265. (In Russ.).
31. Shilkina E.A., Ibe A.A., Sheller M.A., Suxix T.V. [The use of DNA analysis methods in the examination of illegal timber trafficking]. *Sibirskij lesnoj žurnal*. No. 3 (2019): pp. 64-70. (In Russ.).
32. Yanbaev R.Yu., Bakhtina S.Y., Sadykov A.K., Yanbaev Yu.A. [Analysis of the relationship between climatic factors and genetic diversity of pedunculate oak populations in different parts of the Republic of Bashkor-

tostan]. *Vestnik Permskogo universiteta. Ser. Biologija*. Iss. 4 (2022): pp. 327-334. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2022-4-327-334>.

33. Degen B., Blanc-Jolivet C., Bakhtina S., Ianbaev R. Applying targeted genotyping by sequencing with a new set of nuclear and plastid SNP and indel loci for *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Conservation Genetics Resources*. V. 13 (4) (2021): pp. 345-347.

34. Konig A.O., Geburek Th., Turok J. Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe. *Arbora Publishers*. (2005): pp. 281-284.

35. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Not.* V. 6 (2006): pp. 288-295.

36. Vasilyeva Y., Chertov N., Nechaeva Y., Sboeva Y., Pystogova N., Boronnikova S., Kalendar R. Genetic Structure, Differentiation and Originality of *Pinus sylvestris* L. Populations in the East of the East European Plain. *Forests*. V. 12 (2021): p. 999.

37. Yanbaev Y., Sultanova R., Blonskaya L., Bakhtina S., Tagirova A., Tagirov V., Kulagin A. Gene pool of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) under reforestation in extreme environment. *Wood Res.* No. 65 (2020): pp. 459-470.

38. Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T. POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits / Department of Renewable Resources, Univ. of Alberta, Edmonton. Alta, 1999. 238 p.

39. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. V. 20, No. 2 (1994): pp. 176-183.

Статья поступила в редакцию 19.10.2023; одобрена после рецензирования 13.11.2023; принята к публикации 20.11.2023.

The article was submitted 19.10.2023; approved after reviewing 13.11.2023; accepted for publication 20.11.2023.

Информация об авторе

Я. В. Сбоева – ассистент кафедры ботаники и генетики растений.

Information about the author

Ya. V. Sboeva – assistant at the Department of Botany and Plant Genetics.

ГЕНЕТИКА

Научная статья

УДК 575.22:577.29

doi: 10.17072/1994-9952-2023-4-385-393.

Молекулярно-генетический анализ генов *ADRB2*, *NOS3* и *PPARGC1A* у единоборцев города Перми

Анна Владимировна Сорокина^{1, 2✉}, Светлана Витальевна Боронникова³

^{1,3} Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь, Россия, vostanyuta@mail.ru

³ svboronnikova@yandex.ru

Аннотация. Изучение генетической предрасположенности к определенным видам спортивной деятельности позволит научно обосновать проведение отбора наиболее перспективных спортсменов и корректировку их тренировочного процесса, т.к. эти данные влияют на формирование физических качеств спортсменов. Цель данного исследования – выявление взаимосвязи полиморфных вариантов генов *ADRB2* (*Adrenoceptor Beta 2*), *NOS3* (*Nitric Oxide Synthase 3*) и *PPARGC1A* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*), ассоциированных с выносливостью, у занимающихся дзюдо и вольной борьбой спортсменов с разной спортивной квалификацией. Выборка для исследований включала 50 человек, из которых 27 спортсменов, занимающихся дзюдо в спортивной школе «Витязь», и 23 спортсмена, занимающихся вольной борьбой в спортивно-оздоровительном клубе «Планета» г. Перми. В зависимости от спортивной успешности единоборцы были распределены в Группу I с высокой и в Группу II с низкой квалификацией. У единоборцев в возрасте от 10 до 16 лет проведены исследования с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) и выявлены полиморфизмы трех полиморфных локусов: G/T гена *NOS3* (rs1799983), G/A гена *PPARGC1A* (rs8192678) и A/G гена *ADRB2* (rs1042713). Проведен анализ взаимосвязи между аллельными вариантами генов у единоборцев и их спортивной квалификацией; установлены достоверные отличия между Группой I и Группой II для генотипа A/A ($F_{оп} 2.98 > 1.96$ при $p = 0.05$) и генотипа G/G ($F_{оп} 2.60 > 1.96$ при $p = 0.05$) гена *ADRB2*, а также для генотипа G/A гена *PPARGC1A* ($F_{оп} 2.43 > 1.96$ при $p = 0.05$). Частота общего генетического балла (ОГБ), рассчитанного для физического качества «выносливость», на основании полиморфизма генов *ADRB2*, *NOS3* и *PPARGC1A* у 50 единоборцев, варьировалась от 33 до 100. Единоборцы с наибольшим ОГБ имеют высокую квалификацию.

Ключевые слова: полиморфизм генов *ADRB2*, *NOS3*, *PPARGC1A*, спортивная квалификация, общий генетический балл, дзюдоисты, вольные борцы

Для цитирования: Сорокина А. В., Боронникова С. В. Молекулярно-генетический анализ генов *ADRB2*, *NOS3* и *PPARGC1A* у единоборцев города Перми // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 4. С. 385–393. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-385-393>.

Благодарности: авторы выражают благодарность заслуженному тренеру РФ Закирову Рафису Мирзаяновичу из школы по самбо и дзюдо «Витязь» г. Перми, тренеру Попову Алексею Алексеевичу из спортивно-оздоровительного клуба «Планета» на базе МАУ ДО ЦДТ «Шанс» г. Перми, а также студентам ПГНИУ биологического факультета Коряковой Анастасии и Левиной Дарье за помощь во взятии проб буккального эпителия у спортсменов.

GENETICS

Original article

Molecular genetic analysis of *ADRB2*, *NOS3* and *PPARGC1A* genes in martial artists of the city of Perm

Anna V. Sorokina^{1, 2✉}, Svetlana V. Boronnikova³

^{1,3} Perm State University, Perm, Russia

^{2✉} Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia, vostanyuta@mail.ru

³ svboronnikova@yandex.ru

Abstract. The study of genetic predisposition to certain types of sports activities will make it possible to scientifically select the most promising athletes and adjust their training process, since these data influence the for-

mation of the physical qualities of athletes. The purpose of this study is to identify the relationship between polymorphic variants of the *ADRB2* (*Adrenoceptor Beta 2*), *NOS3* (*Nitric Oxide Synthase 3*) и *PPARGC1A* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*) genes associated with endurance in judo and freestyle wrestling athletes with different sports qualifications. The sample for the study included 50 athletes, of which 27 were athletes involved in judo at the «Vityaz» sports school, and 23 athletes involved in freestyle wrestling at the «Planeta» sports and health club in the city of Perm. Depending on their sporting success, the combatants were distributed into Group I with high qualifications and into Group II with low qualifications. In 50 martial artists aged 10 to 16 years, laboratory research was carried out using real-time polymerase chain reaction (PCR-RT) and polymorphisms of three genes were identified: G/T polymorphism of the *NOS3* gene (rs1799983), G/A polymorphism of the *PPARGC1A* gene (rs8192678) and A/G polymorphism of the *ADRB2* gene (rs1042713). An analysis of the relationship between allelic variants of genes in martial artists and their sports qualifications was carried out. An analysis of the relationship between allelic variants of genes in martial artists and their sports qualifications was carried out; significant differences were established between Group I and Group II for genotype A/A ($F_{exp} 2.98 > 1.96$ at $p=0.05$) and genotype G/G ($F_{exp} 2.60 > 1.96$ at $p=0.05$) of the *ADRB2* gene, and also for the G/A genotype of the *PPARGC1A* gene ($F_{exp} 2.43 > 1.96$ at $p=0.05$). The frequency of occurrence of TGS, calculated for the physical quality “endurance”, based on the polymorphism of the *ADRB2*, *NOS3* and *PPARGC1A* genes in 50 martial artists, ranged from 33 to 100. Combatants with the greatest TGS are highly qualified. The relationship between the two samples (Group I with high qualifications and Group II with low qualifications) and TGS, established based on the analysis of polymorphic positions of three genes (*ADRB2*, *NOS3* and *PPARGC1A*) is statistically insignificant.

Keywords: gene polymorphism *ADRB2*, *NOS3*, *PPARGC1A*, sports qualification, total genetic score, judoists, freestyle wrestlers

For citation: Sorokina A. V., Boronnikova S. V. [Molecular genetic analysis of *ADRB2*, *NOS3* and *PPARGC1A* genes in martial artists of the city of Perm]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2023): pp. 385-393. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-385-393>.

Acknowledgments: the authors express their gratitude to the Honored Trainer of the Russian Federation, Rafis Mirzazyanovich Zakirov from the Vityaz School in the city of Perm, coach Alexey Alekseevich Popov from the Planet club on the basis of the MAU DO CDT "Chance" in the city of Perm, as well as students of Perm State National Research University Anastasia Koryakova and Daria Levina for assistance in taking samples of buccal epithelium from athletes.

Введение

Для прогноза развития физических качеств у спортсменов важно изучение генетической предрасположенности к определенным видам спортивной деятельности. Учет влияния аллельных вариантов генов на определенные функции организма спортсмена позволяет более рационально и эффективно распределять тренировочные средства в различных циклах подготовки [Скорина, Врублевский, Врублевская, 2015]. Большинство видов спорта относятся к ациклическим и представляют собой работу переменной интенсивности. Спортсменам необходимо обладать достаточно высоким уровнем развития механизмов энергообеспечения: алактатным и лактатным – анаэробным и аэробным [Гурович, Иванова, 1977]. В отличие от других видов единоборств, основу дзюдо составляют броски, болевые приемы, удержания и удушения [Горбылев, 2001]. Вместе с этим захваты, перевороты, подсечки и активное использование ног являются неотъемлемыми элементами такого вида единоборств, как вольная борьба [Сихымбаев, Утебеков, Мусаев, 2022]. Таким образом, в единоборствах важную роль в достижении успехов играют скоростно-силовые качества и выносливость. В спортивной генетике установлены полиморфные локусы, которые выполняют роль генетических маркеров в спорте. Примерно 36 генетических маркеров связаны с элитным статусом спортсмена, и 39 генетических маркеров показывают индивидуальную изменчивость характеристик физической работоспособности в ответ на выносливость и силовые тренировки [Collins, 2009]. Аллельные варианты генов ассоциированы с проявлением физического качества «выносливость», которое имеет большое значение как в дзюдо, так и в вольной борьбе.

Аллельные варианты генов *NOS3*, *PPARGC1A*, *ADRB2* и другие [Баранов, 2009] ассоциированы с формированием выносливости. Ген *ADRB2* (*Adrenoceptor Beta 2*) кодирует $\beta 2$ -адренергический рецептор, связанный с мобилизацией липидов в жировых клетках человека, обеспечивающий также расслабление гладкой мускулатуры [Тимашева и др., 2015]. Полиморфный локус rs1042713 гена *ADRB2* (аллель A) ассоциируется с проявлением выносливости у спортсменов [Sarpeshkar, Bentley, 2010]. Носительство аллели Gly (аллель G) является неблагоприятным фактором для спортивных результатов и коррелирует со значительным увеличением индекса массы тела, по сравнению с аллелью Arg [Иманбекова и др., 2013]. Ген *NOS3* (*Nitric Oxide Synthase 3*) кодирует фермент – эндотелиальную NO-синтазу, который катализирует образование окиси азота (NO) из L-аргинина. Аллель G (Glu298) этого гена (полиморфный локус rs1799983) является маркером предрасположенности к развитию выносливости, связан с функциями

ми сосудистой, дыхательной систем и чувствительностью к инсулину в клетках печени и скелетных мышц [Рогозкин, Назаров, Казаков, 2000]. Ген *PPARGC1A* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha или PGC1A*) экспрессируется преимущественно в скелетных мышцах медленных мышечных волокон, миокарде, в почках [Finck, Kelly, 2006]. У гена *PPARGC1A* отмечен полиморфный локус Gly482Ser (rs8192678), при этом аллель силы/скорости – Ser (A), а аллель Gly (G), ассоциирован с выносливостью [Ахметов, 2009]. Таким образом, целью данной работы является выявление взаимосвязи полиморфных вариантов генов *ADRB2*, *NOS3* и *PPARGC1A*, ассоциированных с формированием выносливости, у занимающихся в двух спортивных школах г. Перми дзюдо и вольной борьбой спортсменов с разной спортивной квалификацией.

Материал и методы исследования

Выборка для исследований включала 50 спортсменов, из которых 27 спортсменов, занимающихся дзюдо в спортивной школе олимпийского резерва по самбо и дзюдо «Витязь» им. И.И. Пономарева г. Перми, и 23 спортсмена, занимающихся вольной борьбой в спортивно-оздоровительном клубе «Планета» на базе МАУ ДО ЦДТ «Шанс» г. Перми в России. Возраст испытуемых варьировался от 10 до 16 лет. В соответствии со спортивной квалификацией (спортивным разрядом) сформированы две группы спортсменов: Группа I с высокой квалификацией включала 25 единоборцев с 1 юношеским разрядом, а также КМС; среди которых 20 единоборцев мужского пола и 5 – женского. Группа II с низкой квалификацией включала 25 единоборцев, имеющих второй и третий юношеские разряды, из которых 21 спортсмен мужского пола и 4 женского пола. Единоборства являются преимущественно мужскими видами спорта, а потому в выборках преобладали лица мужского пола.

В ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) при использовании подхода распознавания аллелей (Allelic Discrimination) выявлялись аллели генов *NOS3*, *PPARGC1A* и *ADRB2*, а также аллельные варианты генов или генотипы единоборцев, ассоциированные с выносливостью. Забор биологического материала (буккального эпителия) для генетического анализа проводили с помощью соскоба эпителиальных клеток ротовой полости. От каждого спортсмена было получено добровольное согласие на забор биологического материала.

ДНК выделяли сорбентным методом с помощью набора «Проба ГС», изготовленного компанией ООО «ДНК-Технология» (г. Протвино, РФ). Концентрацию проб ДНК определяли с помощью спектрофотометра SpectrofotometrTM NanoDrop 2000 «Thermo scientific» (USA). Реагенты для выявления полиморфных локусов Glu298Asp гена *NOS3* (rs1799983), Gly482Ser гена *PPARGC1A* (rs8192678) и Arg16Gly гена *ADRB2* (rs1042713) синтезированы в ООО «Синтол» (г. Москва, Россия). Реактивы для амплификации ДНК в виде компонентов 2.5* реакционной смеси, содержащей все необходимые компоненты для проведения ПЦР-РВ, 2.5* разбавителя и *Taq*-полимеразы смешивали в нужном объеме непосредственно перед проведением исследования. К реакционной смеси добавляли 5 мкл пробы ДНК каждого единоборца индивидуально. В качестве контроля использовали: а) отрицательный контроль (ОКО); б) положительный контрольный образец (ПКО) для гена *NOS3* – ПКО 1 G/G, ПКО 2 G/T, ПКО 3 T/T; для гена *PPARGC1A* – ПКО 1 G/G, ПКО 2 G/A, ПКО 3 A/A; для гена *ADRB2* – ПКО 1 A/A, ПКО 2 A/G, ПКО 3 G/G. Определение аллелей и генотипов проводилось при помощи программы Bio-Rad (USA) на амплификаторе CFX96 (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System). ПЦР-РВ для амплификации полиморфных локусов проводили по программе, описанной в инструкции к наборам реагентов. По каналу флуоресценции FAM (синий, длина волны возбуждения/детекции 470/515 нм) качественно определялось наличие в пробе аллеля G гена *NOS3*, аллеля G гена *PPARGC1A*, аллеля A гена *ADRB2*. По каналу флуоресценции HEX (зеленый, длина волны возбуждения/детекции 530/560 нм) можно обнаружить аллель T гена *NOS3*, аллель A гена *PPARGC1A* и аллель G гена *ADRB2*. Каждая проба была проанализирована индивидуально. Эксперимент повторялся дважды. ПЦР-РВ проведена при условиях, предусмотренных в инструкции производителя набора реактивов ООО «Синтол». Интерпретация результатов ПЦР-РВ была проведена в программе Bio-Rad CFX Manager по инструкции компании ООО «Синтол».

Анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 6.0 с определением нормальности распределения. Оценка генетической предрасположенности по качеству «выносливость» на основании полученного генного профиля единоборцев проводилась с помощью метода расчета «общего генетического балла» или ОГБ [Williams, Folland, 2008]. ОГБ генного профиля, связанного с физическим качеством «выносливость», рассчитывали по формуле: $ОГБ\ выносливость = (100/6) * (ГБ\ ADRB2 + ГБ\ NOS3 + ГБ\ PPARGC1A)$. Использовали индивидуальные профили следующих полиморфизмов с присвоением их вариантов баллов (0, 1, 2): а) *ADRB2* Arg16Gly полиморфизм: A/A = 2, A/G = 1, G/G = 0; б) *NOS3* Glu298Asp полиморфизм: G/G = 2, G/T = 1, T/T = 0; в) *PPARGC1A* Gly482Ser полиморфизм: G/G = 2, G/A = 1, A/A = 0.

Для хранения и обработки результатов исследований была создана матрица данных в виде электронных таблиц MS Excel 2010. Сравнение несвязанных выборок (ОГБ спортсменов между Группой I с высо-

кой квалификацией и Группой II с низкой квалификацией) осуществлялось критерием Фишера, F-критерий Фишера стандартный равен 1.96 (при $p = 0.05$).

Результаты и обсуждение

В ПЦР в реальном времени при использовании подхода распознавания аллелей («Allelic Discrimination») рост по каналу FAM свидетельствует о присутствии аллеля G гена *NOS3* в пробе ДНК испытуемого. Рост по каналу HEX обозначает наличие аллеля T в пробе ДНК (рис. 1). Соответственно, присутствие обоих аллелей в пробе свидетельствует о наличии генотипа G/T. Рост по каналу FAM указывает на присутствие аллеля G гена *PPARGC1A* и аллеля A гена *ADRB2* в пробе ДНК испытуемого. Рост по каналу HEX обозначает наличие аллеля A гена *PPARGC1A* и аллеля G гена *ADRB2* в пробе ДНК. Соответственно, присутствие обоих аллелей в пробе свидетельствует о наличии генотипа G/A гена *PPARGC1A* и генотипа A/G гена *ADRB2*. Результаты подлежат учету только в случае, когда положительный контрольный образец имеет положительные результаты по каналам FAM и HEX, а отрицательный контрольный образец имеет отрицательные результаты по каналам FAM и HEX. Положительный контрольный образец необходим для определения специфичности набора реагентов к аллелям A и G гена *ADRB2*, аллелям G и A гена *PPARGC1A* и аллелям G и T гена *NOS3*. Отрицательный контрольный образец необходим для подтверждения отсутствия в реакционной смеси контаминации и ингибирования.

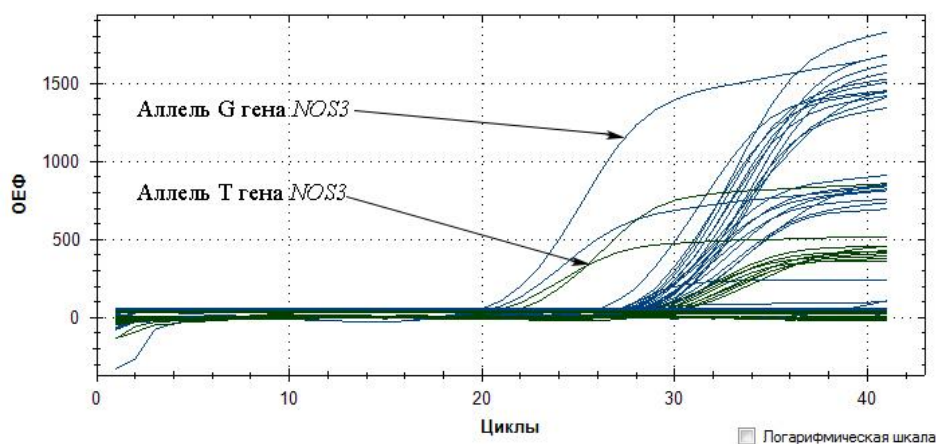


Рис. 1. Кинетические кривые флуоресценции, полученные для проб ДНК из буккального эпителия единоборцев при анализе гена *NOS3*

Цвета, соответствующие каналам детекции флуоресценции: FAM (аллель G гена *NOS3*) – синий, HEX (аллель T гена *NOS3*) – зеленый; ОЕФ – относительные единицы флуоресценции, циклы – циклы амплификации

[Fluorescence kinetic curves obtained for DNA samples from the buccal epithelium of martial artists when analyzing the *NOS3* gene

Colors corresponding to fluorescence detection channels: FAM (G allele of the *NOS3* gene) – blue, HEX (T allele of the *NOS3* gene) – green; RFU – relative fluorescence units, cycles – amplification cycles]

При анализе результатов ПЦР в реальном времени установлено, что частота встречаемости аллелей A и G гена *ADRB2* составила 0.48 и 0.52 соответственно (табл. 1). По результатам распределения частот полиморфных позиций Arg16Gly гена *ADRB2* получены следующие данные: генотип A/A, являющийся наиболее благоприятным для развития физического качества «выносливость», отмечен у 7 из 50 спортсменов, т.е. с частотой 0.14. Самый неблагоприятный генотип для развития физического качества «выносливость» G/G, связанный с увеличением индекса массы тела, был обнаружен у 9 человек, т.е. с частотой 0.18. При этом генотип A/G встречается у большинства спортсменов с частотой 0.68. Данный генотип также является маркером повышенного риска гипертонии у лиц с ожирением [Баранов, 2009].

Анализ распределения генотипов в соответствии с группами квалификации спортсменов показал следующие результаты. При определении полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2* у единоборцев, установлено, что частота аллелей A и G в Группе I спортсменов с высокой квалификацией составила 0.58 (аллель A) и 0.42 (аллель G), а в Группе II с низкими спортивными разрядами – 0.38 и 0.62 соответственно. Анализ частот аллелей у спортсменов Группы I по сравнению с Группой II показал незначимые различия по частоте аллелей A и G ($F_{0.05} 1.93 < 1.96$ при $p = 0.05$). Генотип A/A в исследуемой выборке у спортсменов в Группе I определен с частотой 0.24, у спортсменов из Группы II – с частотой 0.04. Сравнение показало достоверные различия между двумя группами единоборцев по генотипу A/A ($F_{0.05} 2.98 > 1.96$ при $p = 0.05$). Анализ частот гетерозиготного генотипа A/G с частотой 0.68 в обеих группах не выявил значимых отличий между Группой I и Группой II ($F_{0.05} 0.00 < 1.96$ при $p = 0.05$). Самый неблагоприятный генотип G/G,

связанный с увеличением индекса массы тела, с меньшей частотой был выявлен в Группе I (0.08) по сравнению с Группой II (0.28), данные достоверно отличаются по критерию Фишера ($F_{\text{оп}} 2.60 > 1.96$ при $p = 0.05$).

Таблица 1

Частоты аллелей и генотипов генов *ADRB2*, *NOS3* и *PPARGC1A* у единоборцев школы «Витязь» г. Перми и спортивно-оздоровительного клуба «Планета» г. Перми (n=50)

[Frequencies of alleles and genotypes of the *ADRB2*, *NOS3* and *PPARGC1A* genes in martial artists of the «Vityaz» school in Perm and the «Planet» club in Perm (n=50)]

Аллели / Генотипы	Частоты аллелей / генотипов в группах спортивной квалификации (число спортсменов)		Частоты аллелей / генотипов на общую выборку в 50 человек (число спортсменов)	$F_{\text{оп}} > F_{\text{ст}}$
	Группа I с высокой квалификацией (25 человек)	Группа II с низкой квалификацией (25 человек)		
Ген <i>ADRB2</i>				
A	0.58	0.38	0.48	1.93<1.96
G	0.42	0.62	0.52	1.93<1.96
A/A	0.24 (6)	0.04 (1)	0.14 (7)	2.98>1.96
A/G	0.68 (17)	0.68 (17)	0.68 (34)	0.00<1.96
G/G	0.08 (2)	0.28 (7)	0.18 (9)	2.60>1.96
Ген <i>NOS3</i>				
G	0.78	0.70	0.74	0.88<1.96
T	0.22	0.30	0.26	0.88<1.96
G/G	0.60 (15)	0.44 (11)	0.52 (26)	1.54<1.96
G/T	0.36 (9)	0.52 (13)	0.44 (22)	1.55<1.96
T/T	0.04 (1)	0.04 (1)	0.04 (2)	0.00<1.96
Ген <i>PPARGC1A</i>				
A	0.32	0.28	0.30	0.42<1.96
G	0.68	0.72	0.70	0.42<1.96
G/G	0.44 (11)	0.60 (15)	0.52 (26)	1.54<1.96
G/A	0.48 (12)	0.24 (6)	0.36 (18)	2.43>1.96
A/A	0.08 (2)	0.16 (4)	0.12 (6)	1.20<1.96

Примечания: ген *ADRB2* (*Adrenoceptor Beta 2*) полиморфизм A/G; ген *NOS3* (*Nitric Oxide Synthase 3*) полиморфизм G/T; ген *PPARGC1A* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*) полиморфизм G/A; Группа I – спортсмены с высокими спортивными разрядами (1 юн, КМС); Группа II – спортсмены с низкими спортивными разрядами (2 юн, 3 юн); $F_{\text{оп}}$ – F-критерий Фишера, $F_{\text{ст}}$ – критерий Фишера стандартный равен 1.96 (при $p = 0.05$); число спортсменов указано только у генотипов; полужирным шрифтом выделены значимые отличия.

Частота встречаемости аллелей G и T гена *NOS3* у 50 спортсменов составила 0.74 и 0.26 соответственно. Самый неблагоприятный аллель T, который ассоциирован у спортсменов с низкой активностью эндотелиальной NO-синтазы, встречается достоверно реже, чем аллель G ($F_{\text{оп}} 4.80 > 1.96$ при $p = 0.05$). Соответственно, генотип T/T встречается всего у двух спортсменов с частотой 0.04. Этот генотип приводит к снижению у спортсменов продукции монооксида азота, вследствие чего нарушается баланс продукции эндотелиальных вазоактивных факторов [Рогозкин, Назаров, Казаков, 2000]. При этом аллель T связан у спортсменов с риском развития ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда и ишемического инсульта [Flavell et al., 2005]. Генотипы G/G и G/T встречаются с частотой 0.52 и 0.44 соответственно. У спортсменов с генотипом G/G гена *NOS3* отмечается высокая активность эндотелиальной NO-синтазы и высокий уровень продукции монооксида азота, что не нарушает баланс продукции эндотелиальных вазоактивных факторов. Для спортсменов с генотипом G/T характерен средний уровень продукции монооксида азота, вследствие чего нарушается баланс продукции эндотелиальных вазоактивных факторов.

Анализ полиморфной позиции Glu298Asp гена *NOS3* выявил высокую частоту (0.78) благоприятного аллеля G и низкую частоту (0.22) неблагоприятного аллеля T у 25 спортсменов Группы I с высокой квалификацией. В Группе II спортсменов с низкой квалификацией у 25 дзюдоистов частота аллеля G составила 0.70, частота аллеля T – 0.30. Анализ частот генотипов показал незначимые различия между группами спортсменов с разными разрядами: по благоприятному генотипу G/G ($F_{\text{оп}} 1.54 < 1.96$ при $p = 0.05$), по генотипу G/T ($F_{\text{оп}} 1.55 < 1.96$ при $p = 0.05$) и по менее благоприятному генотипу T/T ($F_{\text{оп}} 0.00 < 1.96$ при $p = 0.05$).

Аллели G и A гена *PPARGC1A* у 50 спортсменов встречались с частотами 0.70 и 0.30 соответственно. Генотип G/G выявлен у 26 человек, что свидетельствует о его высокой частоте (0.52). При данном генотипе в организме спортсмена наблюдается увеличенное число митохондрий в клетках и усиление окисления жирных кислот. Генотип G/A был выявлен у 18 спортсменов с частотой 0.36, для данного генотипа

характерно среднее число митохондрий в клетках и средняя степень окисления жирных кислот. При наличии генотипа A/A отмечается пониженное число митохондрий в клетках и низкая степень окисления жирных кислот. Такой генотип был определен у 6 спортсменов с минимальной частотой 0.12. Кроме того, ряд исследований [Brito et al., 2009] показал связь A-аллеля (Ser) полиморфизма с риском развития гипертензии и повышения как систолического, так и диастолического давления в возрасте до 50 лет.

При определении полиморфизма Gly482Ser гена *PPARGC1A* у спортсменов двух групп установлено, что в Группе I спортсменов с высокой квалификацией частота аллелей составила 0.68 (аллель G) и 0.32 (аллель A), а в Группе II спортсменов с низкой квалификацией – 0.72 и 0.28 соответственно. Частота благоприятного для формирования выносливости генотипа G/G в Группе I единоборцев с высокой квалификацией составила 0.44, гетерозиготы G/A – 0.48, а менее благоприятного генотипа A/A – 0.08. В Группе II отмечается рост частоты благоприятного генотипа G/G – 0.60, а также неблагоприятного генотипа A/A – 0.16, частота гетерозиготного генотипа G/A, наоборот, уменьшилась до значения 0.24 в сравнении с Группой I. Анализ частот генотипов гена *PPARGC1A* у единоборцев Группы I и Группы II свидетельствует о незначимых различиях по генотипам G/G и A/A ($F_{оп} 1.54 < 1.96$ и $F_{оп} 1.20 < 1.96$ при $p = 0.05$), а также о том, что генотип G/A достоверно реже встречается в Группе II у спортсменов с низкой квалификацией ($F_{оп} 2.43 > 1.96$ при $p = 0.05$).

В результате исследования было установлено, что у 50 спортсменов частота встречаемости ОГБ, рассчитанного для физического качества «выносливость», на основании полиморфизма трех генов варьировалась от 33 (низкий балл) до 100 – высокий балл (табл. 2). Единоборцы с ОГБ, равным 100, обладают самой высокой предрасположенностью к развитию физического качества «выносливость». У единоборцев с ОГБ, равным 0, отсутствуют генетическая предрасположенность к развитию выносливости. Как отмечают тренеры из изученных спортивных школ, единоборцы с таким ОГБ не обладают необходимым для занятий самбо, вольной борьбой, карате или дзюдо уровнем выносливости и добровольно завершают свою спортивную карьеру.

Таблица 2

Общий генетический балл единоборцев на основании полиморфизма генов *ADRB2*, *NOS3* и *PPARGC1A* (n=50)

[Overall genetic score of martial artists based on the polymorphism of the *ADRB2*, *NOS3* and *PPARGC1A* genes (n=50)]

ОГБ «выносливость»	I группа (25 человек)	II группа (25 человек)	Всего (50 человек)	$F_{оп}$
33	0.04 (1)	0.12 (3)	0.08 (4)	1.46<1.96
50	0.28 (7)	0.28 (7)	0.28 (14)	0.00<1.96
67	0.28 (7)	0.48 (12)	0.38 (19)	1.99>1.96
83	0.36 (9)	0.12 (3)	0.24 (12)	2.78>1.96
100	0.04 (1)	0.00 (0)	0.02 (1)	1.93<1.96

Примечание: сравнение несвязанных выборок (ОГБ спортсменов между Группой I с высокой квалификацией и Группой II с низкой квалификацией) осуществлялось критерием Фишера, F-критерий Фишера стандартный равен 1.96 (при $p = 0.05$); полужирным шрифтом выделены значимые отличия.

Самый высокий показатель ОГБ (100 баллов) среди обследованных спортсменов встречался с частотой 0.02 у 1 единоборца. Высокий показатель ОГБ, равный 83, был отмечен у 12 спортсменов с частотой 0.24. Средний ОГБ (67 баллов), был выявлен с частотой 0.38 у 19 спортсменов, а ОГБ, равный 50, – у 14 спортсменов с частотой 0.28. Частота самого низкого ОГБ по физическому качеству «выносливость» (33 балла) имеет значение 0.08, и отмечается у 4 единоборцев. Анализ полиморфных позиций генов *ADRB2*, *NOS3* и *PPARGC1A*, контролирующих проявление физического качества «выносливость», у групп с разной спортивной квалификацией на основании ОГБ показал, что у 1 спортсмена Группы I с высокой квалификацией наивысший ОГБ (100 баллов) отмечен с частотой 0.04. Высокий результат (83 балла) выявлен у 9 спортсменов с частотой 0.36. Средний показатель предрасположенности к развитию выносливости на основании трех генов (ОГБ, равный 67 баллам и 50 баллам) определен у 14 спортсменов из Группы I с одинаковой частотой 0.28. Низкий показатель ОГБ (33 балла) среди единоборцев Группы I был выявлен у одного спортсмена, частота составила 0.04.

В Группе II с низкой квалификацией выявлены 3 спортсмена с низким показателем ОГБ (33 балла) с частотой 0.12, а также определена большая доля спортсменов со средним показателем ОГБ – 50 и 67 баллов, которая составляет 0.76 у 19 единоборцев. Высокий ОГБ, равный 83, при данной выборке выявлен с частотой 0.12 у 3 спортсменов, что меньше по сравнению с Группой I. Наивысший показатель ОГБ (100 баллов), свидетельствующий о предрасположенности к развитию выносливости, у спортсменов из Группы II не обнаружен.

Распределение показателя ОГБ, рассчитанное для качества «выносливость», на основании полиморфизма генов *ADRB2*, *NOS3* и *PPARGC1A*, представлено на рис. 2/

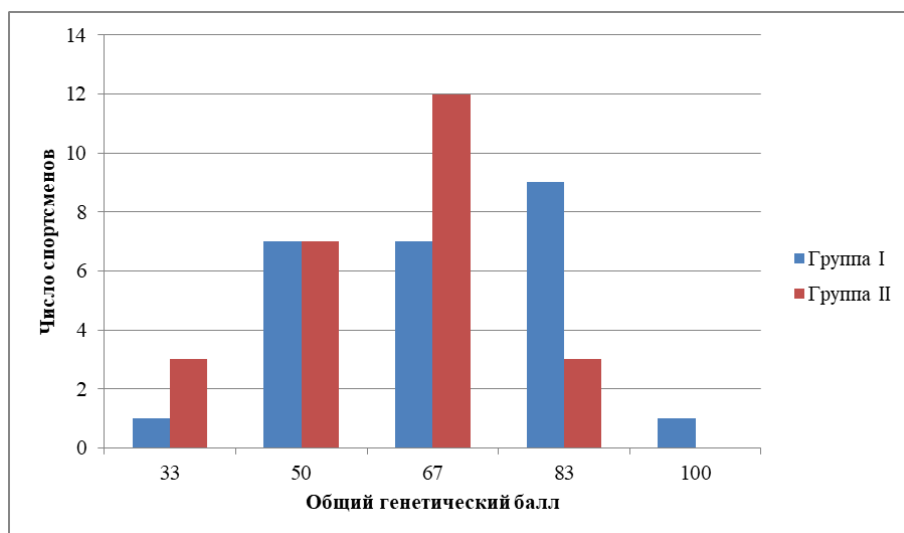


Рис. 2. Распределение общего генетического балла, установленного у единоборцев ($n = 50$) для качества «выносливость», на основании полиморфизма генов *ADRB2*, *NOS3* и *PPARGC1A*

[Distribution of the total genetic score established in martial artists ($n=50$) for the quality “endurance”, based on the polymorphism of the *ADRB2*, *NOS3* and *PPARGC1A* genes]

С помощью критерия Фишера была проведена оценка различий среди двух выборок – общим генетическим баллом между группами с высокой и низкой квалификацией. Анализ частот общего генетического балла, определенного на основании полиморфизма трех генов, у единоборцев Группы I с высокой квалификацией при сравнении с Группой II с низкой квалификацией показал достоверные различия по высокому ОГБ, равному 83, ($F_{\text{оп}} 2.78 > 1.96$ при $p = 0.05$) между группами, а также по среднему ОГБ, равному 67, ($F_{\text{оп}} 1.99 > 1.96$ при $p = 0.05$). Значимых отличий по остальным значениям ОГБ, равным 33, 50 и 100, не выявлено.

При анализе ОГБ у самбистов, дзюдоистов и каратистов [Vostrikova et al., 2022] отмечалось заметное преобладание спортсменов с высокой квалификацией с ОГБ, равным 37.5 и выше. При этом наивысший результат ОГБ = 100 был определен только в Группе I с высокой квалификацией.

Заключение

Полученные данные доказывают, что в процессе отбора отсеиваются спортсмены с неблагоприятными генотипами, т.к. у них не формируется выносливость в нужной для занятий единоборствами степени. Низкую квалификацию имеют в основном спортсмены с наименьшим ОГБ. Это происходит по многим причинам, одной из которых является их низкая работоспособность, обусловленная генетически, и долгое время восстановления после тренировки. Генотипы A/A гена *ADRB2* и G/A гена *PPARGC1A* могут быть использованы в качестве маркерных для определения развития физического качества «выносливость». Данные генетического анализа будут полезны в процессе подготовки единоборцев в спортивных школах, поскольку на их основе можно составлять индивидуальные программы подготовки с учетом генотипа и особенностей физической подготовки конкретного спортсмена. Это должно привести к росту спортивных достижений, сохранению здоровья и увеличению спортивного долголетия [Kambouris et al., 2012].

Для спортсменов с высоким ОГБ (от 83 до 100 баллов) по физическому качеству «выносливость», определенному на основании полиморфизма трех генов, возможны интенсивные нагрузки на тренировках. Спортсменам со средним ОГБ (от 50 до 67 баллов) по физическому качеству «выносливость», приемлема нагрузка умеренной интенсивности.

На основании всех полученных данных можно сделать вывод, что для спортсменов-единоборцев большое значение имеет развитие физического качества «выносливость». Подход определения общего генетического балла позволяет выявить генетическую предрасположенность к формированию физических качеств спортсменов, а также выяснить предрасположенность к развитию различных заболеваний у спортсменов.

Изучение предрасположенности спортсменов к выносливости позволит в дальнейшем повысить надежность и эффективность системы индивидуального отбора и подготовки высококвалифицированных спортсменов. Наличие благоприятных генотипов необходимо учитывать наряду с другими факторами, влияющими на достижения единоборцев в спортивной карьере. Помимо генотипов, в достижении высо-

ких спортивных результатов большую роль играют и другие факторы, такие как, например, морфометрические показатели, физиологическое и психологическое состояние спортсмена.

Список источников

1. Ахметов И.И. Молекулярная генетика спорта. М.: Советский спорт, 2009. 268 с.
2. Баранов В.С. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. 528 с.
3. Горбылёв А.М. Очерк истории дзюдо. От национального признания к олимпийскому виду спорта (рус.) // Додзё. Военские искусства Японии. М.: Будо-спорт, 2001. Вып 8. С. 5–13.
4. Гурович Л.И., Иванова Г.П. Спортивные и подвижные игры: учебник. М.: Физкультура и спорт, 1977. 382 с.
5. Иманбекова М.К. и др. Спорт и генетика // Eurasian Journal of Applied Biotechnology, 2013. № 2. С. 2–12.
6. Rogozkin V.A., Nazarov I.B., Kazakov V.I. Генетические маркеры физической работоспособности человека // Теория и практика физической культуры. 2000. № 12. С. 34–36.
7. Скорина А.А. Прогнозирование наследственной предрасположенности к скоростно-силовой работе в каратэ на основе генетических маркеров // Здоровье для всех: материалы V Междунар. науч.-практ. конф. Пинск, 2013. Ч. I. С. 239–243.
8. Скорина А.А., Врублевский Е.П., Врублевская Л.Г. Организация подготовки юных дзюдоистов с учетом данных генетического анализа // Наука и спорт: современные тенденции. 2015. Т. 6, № 1. С. 56–60.
9. Сихымбаев К.С., Утебеков Е.М., Мусаев А.О. Вольная борьба в Казахстане // Инновации. Наука. Образование. 2022. № 52. С. 896–899.
10. Тимашева Я.Р. и др. Полиморфизм генов бета-адренорецепторов и риск эссенциальной гипертензии // Артериальная гипертензия. 2015. Т. 21, № 3. С. 259–266.
11. Voronnikova S.V. et al. Genetic polymorphism of sportsmen with different sport experience // Human Ecology. 2019. № 8. P. 50–58.
12. Brito E.C. et al. *PPARGC1A* sequence variation and cardiovascular risk-factor levels: a study of the main genetic effects and gene x environment interactions in children from the European Youth Heart Study // Diabetologia. 2009. Vol. 52(4). P. 609–613.
13. Collins M. Basel, Karger, Genes, Athlete Status and Training // Genetics and Sports. Med. Sport Sci. Moscow, 2009. Vol. 54. P. 43–71.
14. Finck B.N., Kelly D.P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease // J. Clin. Invest. 2006. Vol. 116. P. 615–622.
15. Flavell D.M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α gene variation influences age of onset and progression of type 2 diabetes // Diabetes. 2005. Vol. 54. P. 582–586.
16. Kambouris M. et al. Predictive Genomics DNA Profiling for Athletic Performance // Recent Patents on DNA & Gene Sequences. 2012. Vol. 6, № 3. P. 229–239.
17. Sarpeshkar V., Bentley D.J. Adrenergic- β 2 receptor polymorphism and athletic performance // Journal of Human Genetics. 2010. Vol. 55. P. 479–485.
18. Vostrikova A. et al. Gene polymorphism and total genetic score in martial arts athletes with different athletic qualifications // Genes. 2022. Vol. 13, Iss. 9. P. 1677.
19. Williams A.G., Folland J.P. Similarity of polygenic profiles limits the potential for elite human physical performance // The journal of physiology. 2008. Vol. 586, № 1. P. 113–121.

References

1. Ahmetov I.I. *Molekularnaja genetika sporta* [Molecular genetics of sports]. Moscow, Sovetskij sport Publ., 2009. 268 p. (In Russ.).
2. Baranov V.S. *Genetičeskij pasport – osnova individual'noj i prediktivnoj mediciny* [Genetic passport is the basis of individual and predictive medicine]. St-Petersburg, N-L Publ., 2009. 528 p. (In Russ.).
3. Gorbilev A.M. *Očerk istorii dzudo. Ot nacional'nogo priznanija k olimpijskomu vidu sporta* [Essay on the history of judo. From national recognition to an Olympic sport]. Moscow, Budo-sport Publ., 2001, No. 8, pp. 5–13. (In Russ.).
4. Gurovish L.N., Ivanova G.P. *Sportivnye I podvižnye igry* [Sports and outdoor games]. Moscow, Fiskul'tura i sport Publ., 1977. 382 p. (In Russ.).
5. Imanbekova M.K., Zholdibaeva E.V., Esentaev T.K., Mominjaliev K.T. *Sport i genetika* [Sports and genetics]. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, No. 2 (2013): pp. 2–12. (In Russ.).
6. Rogozkin V.A., Nazarov I.B., Kazakov V.I. [Genetic markers of human physical performance]. *Teorija i praktika fizičeskaj kul'tury*. No. 12 (2000): pp. 34–36. (In Russ.).

7. Skorina A.A. [Prediction of hereditary predisposition to speed-strength work in karate based on genetic markers]. *Zdorov'e dlja vsech* [Health for everyone. Materials of the V International Scientific and Practical Conference]. Pinsk, 2013, Part 1, pp. 239-243. (In Russ.).

8. Skorina A.A., Vrublevskiy Ye.P., Vrublevskaya L.G. [Organization of training of young judokas taking into account genetic analysis data]. *Nauka i sport: sovremennye tendencii*. V. 6, No. 1 (2015): pp. 56-60. (In Russ.).

9. Sikhymbayev K.S., Utebekov Ye.M., Musayev A.O. [Freestyle wrestling in Kazakhstan]. *Innovacii. Nauka. Obrazovanie*. No. 52 (2022): pp. 896-899. (In Russ.).

10. Timasheva YA.R., Nasibullin T.R., Imaeva E.B., Mirsaeva G.H., Mustafina O.E. [Polymorphism of beta-adrenergic receptor genes and the risk of essential hypertension]. *Arterial'naja gipertenzija*. V. 21, No 3 (2015): pp. 259-266. (In Russ.).

11. Boronnikova S.V., Vasilyeva Yu.S., Burlutskaya M.Y., Gavrikova E.P. Genetic polymorphism of sportsmen with different sport experience. *Human Ecology*. No. 8 (2019): pp. 50-58.

12. Brito E.C., Vimalaswaran K.S., Brage S., Andersen L.B., Sardinha L.B., Wareham N.J., Ekelund U., Loos R.J., Franks P.W. *PPARGC1A* sequence variation and cardiovascular risk-factor levels: a study of the main genetic effects and gene x environment interactions in children from the European Youth Heart Study. *Diabetologia*. V. 52(4) (2009): pp. 609-613.

13. Collins M. Basel, Karger, Genes, Athlete Status and Training. *Genetics and Sports. Med Sport Sci*. Moscow. V. 54 (2009): pp. 43-71.

14. Finck B.N., Kelly D.P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J. Clin. Invest.* V. 116 (2006): pp. 615-622.

15. Flavell D.M., Ireland H., Stephens J.W. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α gene variation influences age of onset and progression of type 2 diabetes. *Diabetes*. V. 54 (2005): pp. 582-586.

16. Kambouris M., Ntalouka F., Ziogas G., Maffulli N. Predictive Genomics DNA Profiling for Athletic Performance. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*. V. 6, No. 3 (2012): pp. 229-239.

17. Sarpeshkar V., Bentley D.J. Adrenergic- β 2 receptor polymorphism and athletic performance. *Journal of Human Genetics*. V. 55 (2010): pp. 479-485.

18. Vostrikova A., Pechenkina V., Danilova M., Boronnikova S., Kalendar R. Gene polymorphism and total genetic score in martial arts athletes with different athletic qualifications. *Genes*. V. 13, Iss. 9 (2022): p. 1677.

19. Williams A.G., Folland J.P. Similarity of polygenic profiles limits the potential for elite human physical performance. *The journal of physiology*. V. 586, No. 1 (2008): pp. 113-121.

Статья поступила в редакцию 05.11.2023; одобрена после рецензирования 08.11.2023; принята к публикации 20.11.2023.

The article was submitted 05.11.2023; approved after reviewing 08.11.2023; accepted for publication 20.11.2023.

Информация об авторах

С. В. Боронникова – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой ботаники и генетики растений;

А. В. Сорокина – аспирант кафедры ботаники и генетики растений.

Information about the authors

S. V. Boronnikova – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Botany and Plant Genetics;

A. V. Sorokina – Postgraduate student of the Department of Botany and Plant Genetics.

Вклад авторов:

Боронникова С. В. – научное консультирование; обобщение результатов, итоговые выводы.

Сорокина А. В. – написание исходного текста; лабораторный анализ материала; статистическая обработка материала.

Contribution of the authors:

Boronnikova S. V. – scientific consulting; generalization of results, final conclusions.

Sorokina A. V. – writing the source text; laboratory analysis of the material; statistical processing of material.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

ЭКОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 612.6-053.5

doi: 10.17072/1994-9952-2023-4-394-402

**Морфофункциональный статус студентов-первокурсников
смежных поколений на рубеже веков**

М. Л. Отавина¹, И. В. Батенкова¹, И. Н. Гаврилова¹, В. В. Горбунова¹, Н. В. Огарышева¹

¹ Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет, Пермь, Россия
Автор, ответственный за переписку: Наталья Владимировна Огарышева, ogaryseva@pspu.ru

Аннотация. Цель работы – проведение сравнительного анализа ряда антропометрических и физиометрических параметров студентов, обучавшихся на первом курсе ПГГПУ в 2004/2005 и в 2022/2023 учебных гг., принадлежащих двум смежным поколениям. Сравнивались длина и масса тела, артериальное давление, характер регуляторных процессов, а также вычисленные на основе перечисленных показателей индексы: индекс массы тела или индекс Кетле (ИК), индексы функциональных изменений, централизации, напряжения регуляции. Последние два индекса – производные параметров variability ритма сердца (ВРС), позволяющие оценить вклад в работу организма автономного и центрального контуров регуляции и прогнозировать адаптивные ресурсы организма. В обеих выборках зарегистрированы различия между юношами и девушками по массоростовым показателям: юноши выше и тяжелее девушек, кроме тех из них, ИК которых превышает 25 кг/м², т.е. студентов с избыточной массой тела. Однако по росту и весу, юноши и девушки, обследованные в 2022 г., не отличаются от обучавшихся в 2004 г. Функциональные параметры свидетельствуют об отсутствии значимых различий между поколениями конца XX – начала XXI в. по частоте сердечных сокращений, величине наиболее часто встречающегося кардиоинтервала и вкладу в регуляторные процессы автономного и центрального контуров регуляции. Настораживает более высокое артериальное давление, особенно пульсовое, являющееся своеобразным маркером неблагополучия сосудистой стенки крупных артерий у студентов, особенно юношей более позднего поколения, т.е. 2002–2004 гг. рождения. Данные ВРС свидетельствуют о большей устойчивости организма девушек к стрессорным воздействиям. Об этом можно судить по влиянию на характер сердечного ритма центрального и автономного контуров регуляции – у девушек автономная регуляция выражена в большей степени, чем у юношей. Это относится как к выборке 2022, так и 2004 гг. исследования.

Ключевые слова: массоростовые параметры, регуляторные процессы, смежные поколения, адаптация

Для цитирования: Морфофункциональный статус студентов-первокурсников смежных поколений на рубеже веков / М. Л. Отавина, И. В. Батенкова, И. Н. Гаврилова, В. В. Горбунова, Н. В. Огарышева // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 4. С. 394–402. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-394-402>.

ECOLOGY

Original article

Morphofunctional status of first-year students of adjacent generations at the turn of the millennium

M. L. Otavina¹, I. V. Batenkova¹, I. N. Gavrilova¹, V. V. Gorbunova¹, N. V. Ogarysheva¹

Corresponding author: N. V. Ogarysheva, ogaryseva@pspu.ru

Abstract. The aim of this work was to carry out a comparative analysis of a series of anthropometric and physiometric parameters of students who studied in the first year of three faculties of Perm State Humanitarian Pedagogical University (PSHPU) in the academic years 2004/2005 and 2022/2023, that is, students belonging to two adjacent generations. The height and body weight, the blood pressure, the type of regulatory processes, as well as indices calculated on the basis of the listed parameters were compared: body mass index, or Quetelet's index (BMI), Functional Changes Score (FCS), Centralization Index (CI), Regulatory Effort Index (REI). The last two indices are derivatives of the parameters of heart rate variability (HRV), which make it possible to assess the contribution of autonomous and central regulatory circuits to the body processes and to predict the adap-

tive resources of the body. In both samples, there were the expected differences between the male and female participants in terms of weight and height parameters, e.g. the men were taller and heavier than the women, except for those whose BMI exceeded 25 kg/m², i.e. overweight students. However, the students surveyed in 2022 did not demonstrate any differences in the values of the height and weight from those who studied in the same faculties in 2004. The assessment of the functional parameters did not show any significant differences between the generations of the late XX, early XXI century in the heart rate (HR), in the duration of the most frequent RR interval (Mo) and in the contribution of the autonomic and central regulatory circuits to the regulatory processes. What is alarming is the higher blood pressure, especially pulse pressure, which is a kind of marker of the vascular wall abnormalities in the large arteries. It was observed in students, especially young men, of a later generation, i.e. born in 2002-2004. HRV data indicate greater resistance of the women's body to stressing factors. This can be concluded based on the influence of central and autonomous regulation circuits on the characteristics of heart rate: in the women, the autonomous regulatory processes were more intense than in men. Moreover, this fact was reported both in the sample of 2022 and among students examined in 2004.

Keywords: height and weight parameters; regulatory processes; adjacent generations; adaptation

For citation: Otavina M. L., Batenkova I. V., Gavrilova I. N., Gorbunova V. V., Ogarysheva N. V. [Morphofunctional status of first-year students of adjacent generations at the turn of the millennium]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 4 (2023): pp. 394-402. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-394-402>.

Введение

Мониторинг антропометрических и физиометрических параметров является одной из центральных задач медицинского и педагогического сопровождения роста и развития детей и подростков [Красильникова, Айзман, 2017]. С точки зрения изучения процессов акселерации и децелерации важен анализ межпоколенных различий для популяций одного региона [Година, 2004; Драгич, 2006].

Цель работы – сравнительный анализ морфофункционального статуса юношей и девушек смежных поколений конца XX – начала XXI вв.

Материалы и методы исследований

Исследования были проведены в 2004 (1-я выборка) и в 2022 гг. (2-я выборка) у студентов-первокурсников ПГГПУ, факультетов физической культуры, естественнонаучного и филологического. Общее число испытуемых составило 302 человека, возраст варьировался от 18 до 20 лет.

Измеряли рост, массу тела, артериальное давление, регистрировали вариабельность сердечного ритма. Определяли массоростовые соотношения, используя индекс Кетле (ИК), и характер регуляторных процессов. Все измерения проводились при наличии добровольного информированного согласия в утреннее время с использованием складного антропомера, напольных электронных весов, аппарата для измерения артериального давления; студенты находились в состоянии относительного физиологического покоя. Регистрация кардиоинтервалограммы осуществлялась в течение двух минут в положении сидя, с использованием аппаратно-программного комплекса «Варикард 2.51».

По каждому вектору регуляции сердечного ритма выбрано 3 показателя, представляющие собой статистические, волновые и автокорреляционные характеристики интервалограмм (табл. 1).

Поскольку единицы измерения этих параметров разные, согласно формуле Стерджеса, они были приведены к единой (балльной) шкале оценивания с 9 разрядами [Елисеева, Юзбашев, 2004]. Размер шага для каждого параметра высчитывался по формуле:

$$h = (m_{\max} - m_{\min}) / 9$$

где h – размер шага; m_{\max} и m_{\min} – максимальное и минимальное значения соответствующего параметра; 9 – количество разрядов.

Таким образом, каждый отдельный параметр мог быть оценен количеством баллов, пропорциональным его величине, разделенной на размер шага, т.е. мог иметь значение от 1 до 9. Соответственно, сумма показателей каждого вектора регуляции могла составлять от 3 до 27 баллов.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием параметрических и непараметрических методов сравнения выборок в программе Statistica 10.0. Значимость различий выявлялась на основании Т-критерия Стьюдента для независимых переменных. Для сравнения вклада того или иного вида регуляции в работу сердца у студентов разных групп использовались методы непараметрической статистики – тесты Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова. Для сравнения долевых соотношений групп с разным уровнем проявления отдельных параметров, в частности ИК, пульсовое давление (ПД) использовался точный критерий Фишера (четырёхпольные таблицы). Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

Таблица 1

Физиологическая сущность параметров variability ритма сердца (BCP) [Баевский, 1979]**[Physiological essence of heart rate variability (HRV) parameters]**

Вид регуляции	Обозначение	Сущность
Sumsimp (Симпатический)	AMo	Амплитуда моды (доля самого часто встречающегося интервала)
	LF	Мощность низкочастотного компонента спектра
	VLF/HF	Отношение низкочастотного и высокочастотного компонентов спектра интервалограммы
Sumparasimp (Парасимпатический)	pNN50	Доля пар кардиоинтервалов с разностью более 50 мс
	Mo	Наиболее часто, встречающийся интервал
	HF	Мощность высокочастотного компонента спектра
Sumcentr (Центральный)	ИН	Индекс напряжения регуляторных систем
	CC0	Число сдвигов автокорреляционной функции до коэффициента корреляции меньше 0
	IC	Индекс централизации управления ритмом сердца

Результаты и их обсуждение

Решение поставленной задачи – сравнительного анализа антропо-физиометрического статуса студентов разных поколений – потребовало от нас соблюдения максимально приближенного к 2004 г. протокола исследования. Это стало возможным благодаря тематическому потенциалу научно-исследовательской работы и сохранению коллектива кафедры.

Полученные результаты представлены в табл. 2 и 4.

Таблица 2

Морфологические и функциональные показатели студентов (межпоколенное сравнение)**[Morphological and functional indicators of students (intergenerational comparison)]**

Показатели	Юноши				Девушки			
	2022, n=44	2004, n=72	t-value	p	2022, n=96	2004, n=90	t-value	p
Рост, см	176.8	175.7	0.8	0.425	163.8	163.0	0.8	0.450
Вес, кг	70.3	67.6	1.6	0.122	55.9	55.2	0.7	0.514
ИМТ, кг/м ² (ИК)	22.4	21.9	1.1	0.254	20.7	20.9	-0.3	0.763
Mo, мс	795.9	813.7	-0.8	0.410	814.9	793.7	1.1	0.284
ЧСС, уд/мин	76.4	74.2	1.2	0.248	74.9	76.7	-1.2	0.235
САД, мм рт.ст.	128.3	114.5	6.3	0.000	115.6	111.9	2.3	0.024
ДАД, мм рт.ст.	70.1	75.7	-3.1	0.002	68.3	75.0	-5.3	0.000
ПД, мм рт.ст	58.2	39.2	7.9	0.000	47.3	37.1	7.7	0.000
ИФИ, у.е.	1.4	1.3	3.8	0.000	2.0	2.0	-0.1	0.927
Sumsymp	8.8	9.2		>0.10	7.2	7.4		>0.10
Sumparasymp	7.0	7.0		>0.10	8.5	8.3		>0.10
Sumcentr	5.5	6.5		>0.10	4.5	4.7		>0.10

Примечание: обработка данных, представленных в трех последних строках, в табл. 2 и 4 производилась методами непараметрической статистики – тестом Колмогорова-Смирнова.

Отличий между двумя смежными поколениями по массоростовым параметрам: росту, массе тела и вычисленном на их основе ИК – не выявлено ни у юношей, ни у девушек (табл. 2). Соответствие массы тела ростовым параметрам, выражающееся массоростовыми индексами, в том числе и ИК, является отправной характеристикой для оценки физического развития. При этом основное внимание уделяется массе тела, как важному показателю здоровья [Bhviya, Mostata, 1993; Негашева, 2008]. Согласно предложенным А. Кетле градациям, значение индекса менее 18.5 кг/м² свидетельствует о недостаточности массы тела, способствующее, особенно у женщин, развитию ряда патологических состояний. Величина индекса более 25 кг/м² характеризуется как избыточная масса тела и также является неблагоприятным фоном для укрепления здоровья [WHO, 1997]. Названные причины заставляют исследователей со всем вниманием относиться к анализу состояния массоростовых соотношений в молодежных популяциях разных регионов [Синева, Негашева, Попов, 2017].

Мы проанализировали распределение ИК у юношей и девушек, обучавшихся на первом курсе ПГГПУ в 2022 и 2004 гг. На рис. 1 представлено распределение по ИК в обеих выборках. Анализ не выявил существенных различий соотношения этого распределения ни между юношами и девушками, ни между студентами разных поколений. Больше всего студентов с оптимальным ИК – от 18.5 до 24.9 кг/м². Такие

значения ИК зарегистрированы у 77% девушек и 87% юношей в 2022 г. и у 83% как у юношей, так и у девушек в 2004 г. Что касается значения ИК за границами этой условной нормы, то они распределились так: от 2.3% юношей и 14% девушек с низкими значениями ИК в 2022 г. до 4% девушек (2004 г.) и 11% юношей (2022 г.) с повышенными значениями индекса. Однако ни по одному из этих распределений, согласно точному критерию Фишера [Елисеева, Юзбашев, 2004], статистически значимых различий не обнаружено. То есть доли юношей и девушек как с низкими, так и с высокими показателями ИК, не отличаются ни друг от друга, ни год от года. Данные, приведенные в статье о студентах МГУ, обучавшихся там в 2002 г. [Мишкова, Негашева, 2002], свидетельствуют о близости распределения студентов с низкими и высокими значениями ИК. В частности, у 19.5% девушек и 12.5% юношей авторами был зарегистрирован дефицит массы тела. Избыточная масса тела – у 8.9% юношей и 4.5% девушек. Последние данные практически совпадают с полученными нами.

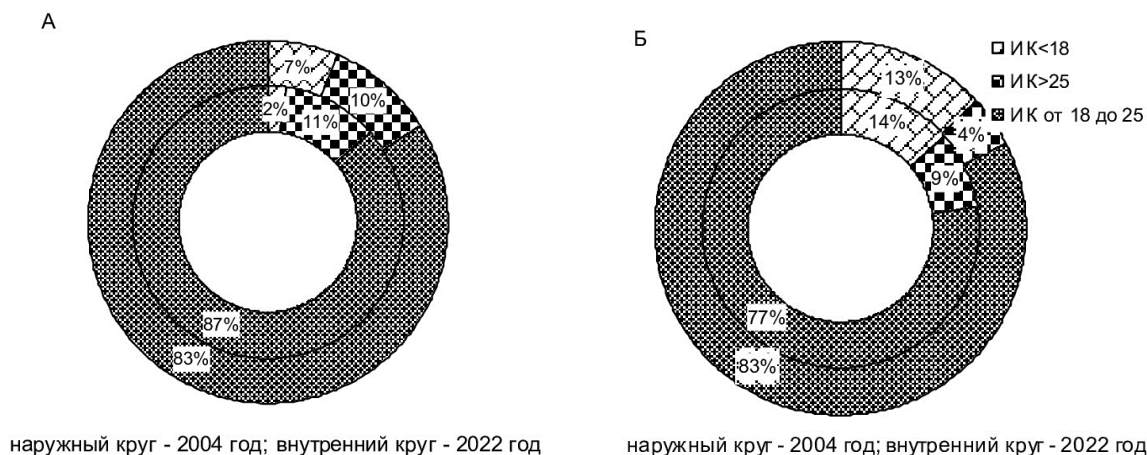


Рис. 1. Распределение значений индекса Кетле у юношей (А) и девушек (Б) в 2022 и 2004 гг. [Distribution of Quetelet index values for boys (A) and girls (B) in 2022 and 2004]

Завершая разговор об ИК, заметим то, что в группе с высоким ИК, а это на сегодня – 11% юношей и 9% девушек, нет отличий между полами по росту и массе тела (рис. 2). В других категориях, то есть в группе с низким ИК, и среди студентов с оптимальными параметрами, юноши статистически достоверно выше и тяжелее, чем девушки.

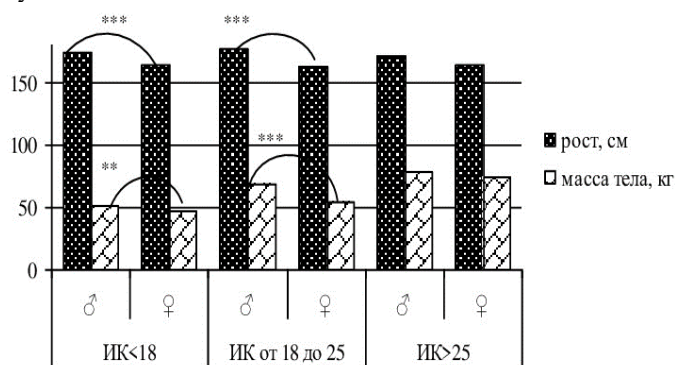


Рис. 2. Рост и масса тела юношей и девушек с разным ИК
Дуга между столбиками соединяет объекты сравнения; различия достоверны при: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

[Height and body weight of boys and girls with different IR]

При сравнении параметров, связанных с работой сердечно-сосудистой системы и индексов, отражающих напряженность, т.е. в определенной степени энерготраты организма, обнаружилось следующее: систолическое артериальное давление (САД) у юношей, обследованных в 2022 г., на 14 мм рт. ст., а у девушек – на 4 мм рт. ст., выше, чем у их сверстников и сверстниц в 2004 г. Диастолическое давление (ДАД), напротив, было в 2004 г. выше, чем в 2022: у юношей на 5.6, у девушек – на 6.7 мм рт. ст. (табл. 2). Пульсовое давление (ПД), представляющее собой разницу систолического и диастолического, в сред-

нем по выборке юношей в 2022 г. составило 58.2 мм рт. ст., что существенно превышает среднее значение нормы для молодых мужчин до 25 лет. По данным Европейской Ассоциации Кардиологов (ЕАК), оно составляет 47 мм рт. ст. У девушек этот показатель в 2022 г. составил 47.3 мм рт. ст., что несколько выше среднего значения для женщин этого возраста, полученного ЕАК в результате продолжительного исследования, – 43 мм рт. ст. В этом исследовании, охватившем мужские и женские группы от 20 лет до 65 и старше, называется предельная величина ПД, которая еще может рассматриваться как норма для мужчин старшего возраста – 60 мм рт. ст. В 2004 г. ПД юношей и девушек было достаточно близким – 39.2 и 37.1 мм рт. ст. соответственно.

По сравнению с 2004 г., в 2022 существенно возросло количество студентов с ПД, превышающим контрольное значение – 60 мм рт. ст. Мы сравнили это количество с числом студентов, имеющих величину ПД в покое ниже 50 мм рт. ст., то есть нормальным ПД (табл. 3). Согласно расчетам, проведенным с использованием 4-польных таблиц, обнаружен высокий уровень достоверности межпоколенных различий как в мужской, так и в женской выборках.

Показатель ПД – очень важная характеристика гемодинамики. Р.В. Хурса [2013, 2018] убедительно доказывает, что ПД, по сути, посредник нейрогуморальной регуляции гемодинамики, ее системообразующий фактор, поскольку функционально отражает ударный объем крови, т.е. степень достаточности кровоснабжения организма в каждый момент времени.

Таблица 3

Количество студентов с высоким и удовлетворительным уровнем пульсового давления в 2022 и 2004 гг.

[Number of students with high and satisfactory levels of pulse pressure in 2022 and 2004]

Показатели	юноши			девушки		
	2022, n=44	2004, n=72	p	2022, n=96	2004, n=90	p
ПД ≥60мм рт. ст.	19	2	0,000	14	1	0,0001
ПД ≤50мм рт. ст.	16	63		62	88	

Повышение ПД во время физической нагрузки – рациональная реакция организма, при которой несколько повышается систолическое и снижается диастолическое давление; после нагрузки оба эти показателя быстро возвращаются к исходным величинам. В состоянии относительного физиологического покоя повышенное ПД – показатель неблагополучия сосудистой системы [Тарловская, Мережанова, 2018]. По мнению большинства специалистов, это, прежде всего, ригидность сосудистой стенки, ее преждевременное старение [Кобалава, Шаварова, 2017]. При этом чувствительность данного показателя такова, что повышение ПД обнаруживается задолго до клинических проявлений сосудистых нарушений, например, при семейной форме гиперхолестеринемии [Корнева, Кузнецова, Тихова, 2018].

Еще один расчетный показатель – индекс функциональных изменений (ИФИ). Его формула включает: рост и массу тела, возраст, артериальное давление, частоту сердечных сокращений. Для каждого показателя эмпирически подобраны соответствующие коэффициенты. ИФИ отражает адаптационные резервы организма; более высокие значения этого показателя – свидетельство меньших адаптационных возможностей индивида [Баевский, Берсенева, 1997]. Если значение не превышает 2.1 ед., адаптационные резервы считаются достаточными, адаптация достигается без избыточного напряжения, за счет внутренних резервов организма; значение индекса тем выше, чем выше напряжение адаптации. Индекс выше 2.6 – свидетельство неудовлетворительной адаптации; более 3 – срыва адаптации.

ИФИ у юношей и девушек, как в 2004, так и в 2022 гг., в среднем по выборкам находился в границах удовлетворительной адаптации (см. табл. 2). В то же время, во-первых, средние значения ИФИ девушек вплотную приближены к уровню условной нормы; во-вторых, 7 девушек в 2022 и 2 в 2004 гг. имели ИФИ выше 2.6. У девушек этот показатель существенно выше в обеих выборках в сравнении с юношами, что свидетельствует о более низких адаптационных резервах.

В таблице 4 показаны отличия вклада разных видов регуляции у юношей и девушек. Эти величины получены при расшифровке показателей вариационного ряда кардиоинтервалов, разные волны которого отражают вклад в регуляцию работы сердца автономного и центрального контуров регуляции [Баевский, 1979].

Симпатическая регуляция, представляющая собой по сравнению с парасимпатической, энергетически и психологически более затратный регуляторный компонент, у юношей проявлялась в большей степени, чем у девушек, как в 2022, так и в 2004 гг. Парасимпатическая, напротив, имеет несколько меньшую степень проявления; при этом различия не достигают уровня статистической значимости ($p > 0.10$), поэтому может считаться равной у юношей и девушек. Уровень централизации управления ритмом сердца (Sumcentr) у юношей был значительно выше, чем у девушек; в выборках 2022 (5.5 ед. у юношей и 4.5 ед. у девушек) и 2004 (6.5 и 4.7 ед., соответственно) гг. Центральный контур регуляции отражает «физиологическую цену» адаптации. Поскольку влияние высших отделов центральной нервной системы (ЦНС),

вплоть до корковых, реализуется через нижерасположенные отделы, то характеризуется «навязыванием» своего влияния на эти отделы. При этом регуляция отклоняется от оптимального уровня, и энерготраты возрастают пропорционально степени вмешательства высших отделов ЦНС в деятельность нижних [Михайлов, 2000].

Таблица 4

Морфологические и функциональные показатели студентов (сравнение юношей и девушек в каждой выборке)

[Morphological and functional indicators of students (comparison of boys and girls in each sample)]

Показатели	Год обследования							
	2022				2004			
	Юноши, n=44	Девушки, n=96	t-value	p	Юноши, n=72	Девушки, n=90	t-value	p
Рост, см	176.9	163.8	11.0	0.000	175.7	163.0	11.1	0.000
Вес, кг	70.3	55.9	9.1	0.000	67.6	55.2	9.5	0.000
ИМТ, кг/м ² (ИК)	22.4	20.9	3.0	0.003	21.9	20.7	2.9	0.004
САД, мм рт.ст.	128.32	115.6	5.3	0.000	114.5	111.9	1.8	0.080
ДАД, мм рт.ст.	70.1	68.3	1.1	0.271	75.7	74.3	0.9	0.396
ПД, мм рт.ст	58.2	47.3	4.8	0.000	39.2	37.1	1.6	0.111
ИФИ, у.е.	1.4	2.0	-11.3	0.000	1.3	2.0	-19.6	0.000
Sumsymp	8.8	7.2		<0.05	9.2	7.4		<0.05
Sumparasymp	7.0	8.5		>0.10	7.0	8.3		>0.10
Sumcentr	5.5	4.5		<0.05	6.5	4.7		<0.05

Таким образом, можно считать, что перераспределение регуляторных процессов не подверглось существенным изменениям, студенты смежных поколений начала XXI в. имеют одинаковое распределение компонентов регуляции. Причем у девушек симпатическая и центральная регуляции выражены в меньшей степени, чем у юношей (рис. 3).

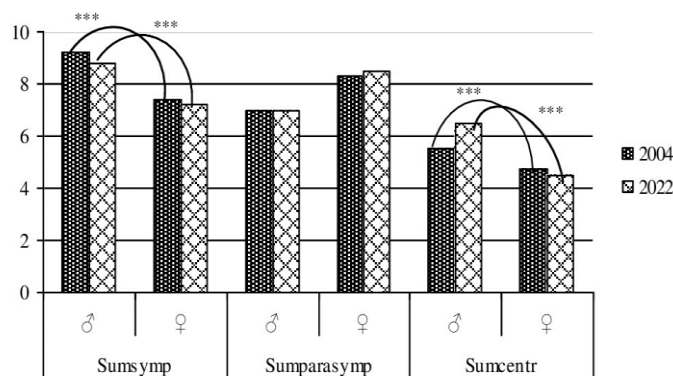


Рис. 3. Вклад отдельных видов регуляции в работу сердца у юношей и девушек в 2004 и 2022 гг. Дуга между столбиками соединяет объекты сравнения; различия достоверны при: *** p < 0.001 [The contribution of certain types of regulation to the work of the heart in boys and girls in 2004 and 2022]

Заключение

Работа, результаты которой представлены в данной статье, с одной стороны, позволяет признать, что длина и масса тела студенческой молодежи за последние два десятилетия в Перми не претерпели существенных изменений. Это согласуется с данными уже упоминавшегося исследования И.М. Синевой с соавт. [Синева, Негашева, Попов, 2017], отметивших стабильность длины и массы тела молодых людей 4 городов России, наблюдающуюся в течение 15 лет. Авторы особенно подчеркнули, что в городах-миллионниках – Москве и Самаре – зарегистрированы высокий уровень и стабильность физического развития и хорошие адаптационные ресурсы организма студентов. С другой стороны, у пермских студентов проявляется тенденция к перераспределению массоростового параметра – ИК: у юношей – в

пользу увеличения доли студентов с недостаточной массой тела, у девушек – понижения доли студентов с избыточной массой тела.

Что касается физиологических параметров, то при стабильном физическом состоянии и сохранных адаптационных ресурсах произошли определенные сдвиги в работе сердечно-сосудистой системы. В частности, обращает на себя внимание резкое возрастание доли юношей и девушек с высоким уровнем пульсового давления – показателя, являющегося предиктором сосудистого неблагополучия.

Список источников

1. Баевский Р.М. Прогнозирование состояний на грани нормы и патологии. М.: Медицина, 1979. 205 с.
2. Баевский Р.М., Берсенева А.П. Оценка адаптационных возможностей организма и риск развития заболеваний. М.: Медицина, 1997. 265 с.
3. Година Е.З. Некоторые тенденции соматического развития московских школьников на рубеже столетий // Воспитываем здоровое поколение: материалы IV междунар. конф. 2004. С. 36-40.
4. Драгич О.Ю. Закономерности морфофункциональной изменчивости организма студентов юношеского возраста в условиях Уральского федерального округа: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Тюмень, 2006. 41 с.
5. Елисеева И.И., Юзбашев М.М. Общая теория статистики. М.: Финансы и статистика, 2004. 656 с.
6. Кобалава Ж.Д., Шаварова Е.К. Клинические особенности артериальной гипертонии в пожилом и старческом возрасте и обоснование применения комбинации амлодипин / индапамид ретард. // Кардиология. 2017. Т. 57, № 8. С. 60–70.
7. Корнева В.А., Кузнецова Т.Ю., Тихова Г.П. Оценка показателей жесткости сосудистой стенки у лиц с семейной гиперхолестеринемией без артериальной гипертензии // Кардиология, 2018. Т. 58, № 2. С. 24–32.
8. Красильникова В.А., Айзман Р.И. Морфофункциональные показатели первокурсников тувинского государственного университета из городской и сельской местности // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета, 2017. Т. 7, № 5. С. 176–188.
9. Мишкова Т.А., Негашева М.А. Характеристика физического развития юношей-студентов МГУ 16-18 лет. М., 2002. – Деп. в ВИНТИ, № 1010-B2002.
10. Михайлов В.М. Вариабельность ритма сердца. Опыт практического применения. Иваново, 2000. 200 с.
11. Негашева М.А. Морфологическая конституция человека в юношеском периоде онтогенеза (интегральные аспекты): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2008. 48 с.
12. Синева И.М., Негашева М.А., Попов Ю.М. Сравнительный анализ уровня физического развития студентов разных городов России И.М. // Вестник Московского университета. Серия XXIII Антропология. 2017. № 4. С.17–27.
13. Тарловская Е. И. Мережанова А. А. Суточная вариабельность жесткости артерий пациентов с артериальной гипертензией в зависимости от категории сердечно-сосудистого риска. // Кардиология. 2018. Т. 58, № 11S. С. 47–57.
14. Хурса Р.В. Пульсовое давление крови: роль в гемодинамике и прикладные возможности в функциональной диагностике // Медицинские новости. 2013. № 4. С. 13–18.
15. Хурса Р.В. Дисфункциональные типы кровообращения у практически здоровых молодых людей: особенности функционального состояния сосудов и центральной гемодинамики // Международный журнал сердца и сосудистых заболеваний. 2018. Т. 6, № 17. С. 26–35.
16. Bhviya A., Mostata G. Level and differentials in weight, height and body // J. Biosoc. Sci. 1993. Vol. 25, № 1. P. 31–38.
17. WHO. WHO's global healthy work approach. A strategy for the development of a comprehensive approach towards the promotion of health of all working populations. Geneva: World Health Organization, 1997. P. 24–27.

References

1. Baevskij R.M. *Prognozirovanie sostoyanij na grani normy i patologii* [Prediction of conditions on the verge of norm and pathology]. Moscow, Medicina Publ., 1979. 205 p. (In Russ.).
2. Baevskij R.M., Berseneva A.P. *Ocenka adaptacionnyh vozmozhnostej organizma i risk razvitiya zabolevanij* [Assessment of the body's adaptive capabilities and the risk of developing diseases]. Moscow, Medicina Publ., 1997. 265 p. (In Russ.).
3. Godina E.Z. [Some trends in the somatic development of Moscow schoolchildren at the turn of the century]. *Vospityvaem zdravoe pokolenie: materialy IV mezhdunar. konf.* [Raising a healthy generation: materials of the IV international conference], 2004: pp. 36-40. (In Russ.).

4. Dragich O.Yu. *Zakonomernosti morfofunkcional'noj izmenchivosti organizma studentov yunosheskogo vozrasta v usloviyah Ural'skogo federal'nogo okruga Avtoref. diss. d-ra biol. nauk* [Regularities of morphofunctional variability of the organism of adolescent students in the conditions of the Ural Federal District. Abstract Doct. Diss.] Tyumen, 2006. 41 p. (In Russ.).
5. Eliseeva I.I., Yuzbashev M.M. *Obshhaya teoriya statistiki* [General theory of statistics] / Moscow, Finansy` i statistika Publ., 2004. 656 p. (In Russ.).
6. Kobalava Zh. D., Shavarova E. K. [Clinical features of arterial hypertension in the elderly and senile age and the rationale for the use of the combination of amlodipine / indapamide retard]. *Kardiologiya*. V. 57, No. 8 (2017): pp. 60-70. (In Russ.).
7. Korneva V. A., Kuznecova T. Yu., Tixova G. P. [Evaluation of vascular wall stiffness in persons with familial hypercholesterolemia without arterial hypertension]. *Kardiologiya*. V. 58, No. 2 (2018): pp. 24-32. (In Russ.).
8. Krasil'nikova V.A., Ajzman R. I. [Morphofunctional indicators of first-year students of Tuva State University from urban and rural areas]. *Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta*. V. 7, No 5 (2017): pp. 176-188. (In Russ.).
9. Mishkova T.A., Negasheva M.A. *Xarakteristika fizicheskogo razvitiya yunoshej-studentov MGU 16-18 let* [Characteristics of the physical development of male students of Moscow State University aged 16-18 years]. Moscow, 2002. Dep. VINITI №1010-V2002. (In Russ.).
10. Mixajlov V.M. *Variabel'nost' ritma serdca. Opyt prakticheskogo primeneniya* [Heart rate variability. Practical experience]. Ivanovo, 2000. 200 p. (In Russ.).
11. Negasheva M.A. *Morfologicheskaya konstituciya cheloveka v yunoshekom periode ontogeneza (integral'ny'e aspekty)* Avtoref. diss. d-ra biol. nauk [Morphological constitution of a person in the youthful period of ontogenesis (integral aspects). Abstract Doct. Diss.]. Moscow, 2008. 48 p. (In Russ.).
12. Sineva I.M., Negasheva M.A., Popov Yu.M. [Comparative analysis of the level of physical development of students in different cities of Russia] *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya XXIII Antropologiya*. No. 4 (2017): pp. 17-27. (In Russ.).
13. Tarlovskaya E. I., Merezhanova A. A. [Daily variability of arterial stiffness in patients with arterial hypertension. depending on the category of cardiovascular risk]. *Kardiologiya*. V. 58, No. 11 (2018): pp. 47-57. (In Russ.).
14. Xursa R.V. [Pulse blood pressure: role in hemodynamics and applications in functional diagnostics] *Medicinskie novosti*. No. 4 (2013): pp.13-18. (In Russ.).
15. Xursa R.V. [Dysfunctional types of blood circulation in practically healthy young people: features of the functional state of blood vessels and central hemodynamics] *Mezhdunarodnyj zhurnal serdca i sosudistyh zabolevanij*. V. 6, No. 17 (2018): pp. 26-35. (In Russ.).
16. Bhviya A., Mostata G. Level and differentials in weight, height and body //J. Biosoc.Sci. 1993. – Vol. 25, № 1. P. 31-38.
17. WHO. WHO's global healthy work approach. A strategy for the development of a comprehensive approach towards the promotion of health of all working populations // Geneva, World Health Organization. 1997. P. 24-27.

Статья поступила в редакцию 24.09.2023; одобрена после рецензирования 27.10.2023; принята к публикации 20.11.2023.

The article was submitted 24.09.2023; approved after reviewing 27.10.2023; accepted for publication 20.11.2023.

Информация об авторах

Марина Львовна Отавина – otavina@pspu.ru, канд. мед. наук, доцент, зав. кафедрой анатомии, физиологии, химии и безопасности жизнедеятельности;

Ирина Валентиновна Батенкова – batenkova@pspu.ru, канд. биол. наук, доцент каф. анатомии, физиологии, химии и безопасности жизнедеятельности;

Ирина Николаевна Гаврилова – gavrilova_in@pspu.ru, канд. биол. наук, доцент каф. анатомии, физиологии, химии и безопасности жизнедеятельности;

Виктория Владимировна Горбунова – vitagorbunova@mail.ru, канд. биол. наук, доцент каф. анатомии, физиологии, химии и безопасности жизнедеятельности;

Наталья Владимировна Огарышева – ogaryseva@pspu.ru, канд. биол. наук, доцент каф. анатомии, физиологии, химии и безопасности жизнедеятельности.

Information about the authors

Marina L. Otavina – otavina@pspu.ru, candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of Department of anatomy, physiology, chemistry and life safety;

Irina V. Batenkova – batenkova@pspu.ru, candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of anatomy, physiology, chemistry and life safety;

Irina N. Gavrilova – gavrilo_in@pspu.ru, candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of anatomy, physiology, chemistry and life safety;

Victoria V. Gorbunova – vitagorbunova@mail.ru, candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of anatomy, physiology, chemistry and life safety;

Natalia V. Ogarysheva – ogaryseva@pspu.ru, candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of anatomy, physiology, chemistry and life safety.

Вклад авторов:

Отавина М. Л. – развитие методологии; статистическая обработка материала; доработка текста; итоговые выводы.

Батенкова И. В. – концепция исследования; развитие методологии; статистическая обработка материала; доработка текста.

Гаврилова И. Н. – статистическая обработка материала; доработка текста; итоговые выводы.

Горбунова В. В. – научное руководство; концепция исследования; развитие методологии; написание исходного текста; итоговые выводы.

Огарышева Н. В. – статистическая обработка материала; доработка текста; итоговые выводы.

Contribution of the authors:

Otavina M. L. – methodology development; statistical processing of the material; followon revision of the text; final conclusions.

Batenkova I. V. – research concept; methodology development; statistical processing of the material; followon revision of the text.

Gavrilova I. N. – statistical processing of the material; followon revision of the text; final conclusions.

Gorbunova V. V. – scientific management; research concept; methodology development; writing the draft; final conclusions.

Ogarysheva N. V. – statistical processing of the material; followon revision of the text; final conclusions.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

ИММУНОЛОГИЯ

Обзорная статья

УДК 632.939:612.112.94:612.63

doi: 10.17072/1994-9952-2023-4-403-413

Галектин-9/Tim-3-зависимый механизм регуляции функциональной активности натуральных киллеров при беременности

Екатерина Григорьевна Орлова^{1, 5} ✉, Ольга Александровна Логинова²,
Ольга Леонидовна Горбунова³, Сергей Викторович Ширшев⁴

¹⁻⁴ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

⁵ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

^{1, 5} ✉ orlova_katy@mail.ru

² jallopukki@ya.ru

³ olia15_77@mail.ru

⁴ shirshev@iegm.ru

Аннотация. Галектинами называют семейство β-галактозид-связывающих низкомолекулярных белков (лектинов), гомологичных по аминокислотной последовательности углевод-связывающего сайта. Галектины взаимодействуют с гликанами на поверхности клеток и участвуют в регуляции функциональной активности большинства клеток организма человека. Галектин-9 играет важнейшую роль в контроле функций клеток иммунной системы. Особое значение приобретают иммунорегуляторные эффекты галектина-9 при беременности, когда его продукция клетками трофобласта значительно увеличивается, что ассоциировано с формированием периферической иммунной толерантности. Основным лигандом для галектина-9 является молекула Tim-3 (Т-клеточный иммуноглобулиновый и муциновый домен, содержащий белок 3), высокая экспрессия которой выявляется на натуральных киллерах (НК-клетки). При беременности фенотип и функции НК-клеток существенно меняются, что необходимо для предотвращения цитотоксических реакций на клетки плода. В обзоре систематизированы данные о роли галектина-9 в Tim-3-опосредованной регуляции функций НК-клеток в аспекте беременности. Изучение регуляции функциональной активности НК-клеток необходимо для повышения эффективности НК-клеточной терапии.

Ключевые слова: галектин-9, НК-клетки, Tim-3, иммунная толерантность, беременность

Для цитирования: Галектин-9 как модулятор функциональной активности натуральных киллеров при беременности / Е. Г. Орлова, О. А. Логинова, О. Л. Горбунова, С. В. Ширшев // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 4. С. 403–413. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-403-413>.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 22-25-00694.

IMMUNOLOGY

Review article

Galectin-9/Tim-3-dependent mechanism of regulation of functional activity of natural killers during pregnancy

Ekaterina G. Orlova^{1,5} ✉, Olga A. Loginova², Olga L. Gorbunova³,
Sergey V. Shirshv⁴

¹⁻⁴ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the RAS, Perm, Russia

⁵ Perm State National Research University, Perm, Russian Federation Perm, Russia

^{1, 5} ✉ orlova_katy@mail.ru

² jallopukki@ya.ru

³ olia15_77@mail.ru

⁴ shirshev@iegm.ru

Abstract. Galectins are a family of β-galactoside-binding low molecular weight proteins (lectins) homologous in the amino acid sequence of the carbohydrate-binding site. Galectins interact with glycans on the cell surface and are involved in regulating the functional activity of most cells of the human body. Galectin-9

plays a crucial role in controlling the functions of cells of the immune system. Of particular importance are the immunoregulatory effects of galectin-9 during pregnancy, when its production by trophoblast cells increases significantly, which is associated with the formation of peripheral immune tolerance. The main ligand for galectin-9 is the Tim-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3) molecule, whose high expression is detected on natural killers (NK cells). During pregnancy, the phenotype and functions of NK cells change significantly, which is necessary to prevent cytotoxic reactions to fetal cells. The review systematizes data on the role of galectin-9 in Tim-3-mediated regulation of NK cell functions in the aspect of pregnancy. The study of the regulation of the functional activity of NK cells is necessary to increase the effectiveness of NK cell therapy.

Keywords: galectin-9, NK cells, Tim-3, immune tolerance, pregnancy

For citation: Orlova E. G., Loginova O. A., Gorbunova O. L., Shirshov S. V. [Galectin-9/Tim-3-dependent mechanism of regulation of functional activity of natural killers during pregnancy]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2023): pp. 403-413. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-403-413>.

Acknowledgments: the work was supported by the Russian Science Foundation, Project №22-25-00694.

Введение

Галектинами называют семейство β -галактозид-связывающих низкомолекулярных белков (лектинов), гомологичных по аминокислотной последовательности углеводов-связывающего сайта и распознающих остатки β -галактозы [Рапопорт, Курмышкина, Бовин, 2008; Рапопорт, Бовин, 2015]. В настоящее время у млекопитающих идентифицировано 16 представителей семейства галектинов, которые отличаются друг от друга строением и углеводной специфичностью [там же]. Галектины продуцируются разными типами клеток (эпителиальными, фибробластами, эндотелиальными, дендритными клетками, макрофагами, активированными Т- и В-лимфоцитами, костномозговыми стромальными клетками, натуральными киллерами (NK-клетки), регуляторными Т-лимфоцитами (Treg) и присутствуют во многих тканях и органах: плаценте, легких, печени, костном мозге, селезенке, сердце, лимфатических узлах, предстательной железе и др. [Рапопорт, Бовин, 2015; Iwasaki-Hozumi et al., 2021; Boron et al., 2022; Fuselier et al., 2023]. Галектины синтезируются и локализируются в цитоплазме клетки и в незначительных количествах присутствуют в ядре, а также при активации клетки секретируются в межклеточное пространство [Рапопорт, Курмышкина, Бовин, 2008; Рапопорт, Бовин, 2015]. Секреция галектинов осуществляется, главным образом, в ответ на провоспалительные стимулы при помощи микровезикул, которые образуются выпячиванием мембраны, минуя эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи [там же]. Галектины оказывают как дистантные эффекты, так и способны связываться с компонентами гликокаликса клеток-продукторов [там же]. Лигандами для галектинов являются углеводные цепи гликолипидов и гликопротеинов в составе различных клеток организма [там же]. Причем галектины могут вступать во взаимодействие как с гликанами разных клеток, обеспечивая межклеточные коммуникации, так и сшивать углеводные структуры на поверхности одной клетки [Рапопорт, Курмышкина, Бовин, 2008; Рапопорт, Бовин, 2015]. Внутри клетки галектины принимают участие в сигнальной трансдукции, взаимодействуя с другими белками цитоплазмы и ядра. Есть данные о том, что галектины участвуют в сплайсинге матричных РНК. Описаны специфические мембранные и внутриклеточные рецепторы для галектинов [там же].

Галектины играют важную роль в регуляции большинства клеточных процессов, таких как дифференцировка клеток, адгезия, межклеточные коммуникации, реализация эффекторных функций, индукция апоптоза, отторжение трансплантата [Iwasaki-Hozumi et al., 2021]. Концентрация галектинов повышается при воспалительных процессах [Iwasaki-Hozumi et al., 2021; Boron et al., 2022; Fuselier et al., 2023]. Избыточная экспрессия галектинов характерна для опухолевых клеток различного происхождения, что свидетельствует об их важной роли в прогрессии опухолевого роста в результате иммуносупрессии [Fuselier et al., 2023]. Некоторые галектины участвуют в адгезии вирусов к поверхности клеток-мишеней [Elahi et al., 2012].

Эффекты галектинов, главным образом, имеют противовоспалительный характер и направлены на ограничение избыточной активации клеток при воспалительных реакциях, защиту клеток от повреждений и индукции аутоиммунных процессов [Sanchez-Fueyo et al., 2003; Zhu et al., 2005]. Однако разные галектины в зависимости от типа клеток и используемых рецепторов оказывают разнонаправленные эффекты на их функциональную активность. Так, взаимодействие галектина-9 с дендритными клетками, макрофагами, Treg стимулирует их активность, тогда как его связывание с рецепторами на Т-лимфоцитах хелперах (Th1) вызывает их апоптоз [Sanchez-Fueyo et al., 2003; Zhu et al., 2005; Nagahara et al., 2008; Osana-Guzman, Torre-Bouscoulet, Sada-Ovalle, 2016]. Все вышесказанное свидетельствует о высокой актуальности изучения регуляторных эффектов разных типов галектинов.

Установлено, что галектин-9, действуя через Tim-3-рецепторы (Т-клеточный иммуноглобулиновый и муциновый домен, содержащий белок 3), препятствует отторжению аллогенного кожного лоскута и ускоряет его приживление [Wang et al., 2008]. Беременность также является феноменом полуаллогенной

трансплантации, поскольку плод экспрессирует антигены отца. Ключевыми эффекторами формирования периферической иммунной толерантности при беременности являются натуральные киллеры (NK-клетки), которые в большом количестве экспрессируют Tim-3 [Sun et al., 2016; Li et al., 2017]. Логично полагать, что галектин-9-Tim-3-сигналинг при беременности играет значимую роль в модуляции функций NK-клеток и сохранении беременности. Поэтому целью данного обзора является систематизация знаний о роли галектина-9 в Tim-3-опосредованном контроле функций NK-клеток в аспекте беременности. Понимание механизмов регуляции функциональной активности NK-клеток при беременности необходимо для прогнозирования и предотвращения патологий беременности иммунного генеза (бесплодие, задержку внутриутробного роста, повторные выкидыши и др.), а также для повышения эффективности NK-клеточной терапии.

Галектин-9

Галектин-9 относят к тандемному типу галектинов, для которых характерно наличие двух углевод-связывающих доменов, распознающих разные углеводные лиганды [Рапопорт, Курмышкина, Бовин, 2008; Рапопорт, Бовин, 2015]. Галектин-9 впервые был идентифицирован как хемоаттрактант для эозинофилов [Asakura et al., 2002]. Он продуцируется разными типами клеток: эозинофилами, эндотелиальными клетками, CD4⁺ и CD8⁺T-лимфоцитами, дендритными клетками, макрофагами, лимфоидными клетками, клетками Купфера, эпителиальными клетками кишечника, клетками трофобласта и плаценты [Enninga et al., 2018; Iwasaki-Hozumi et al., 2021]. Продукция галектина-9 усиливается при воспалении, онкологических и аутоиммунных заболеваниях [Chen et al., 2023]. Интерферон-гамма (INF-гамма) повышает экспрессию галектина-9 в эндотелиальных клетках и фибробластах, что объясняет механизм обратной связи в негативной регуляции Th1-воспалительного ответа [Imaizumi et al., 2002; Asakura et al., 2002].

Во время беременности клетки трофобласта активно продуцируют галектин-9, и его концентрация значительно нарастает в периферической крови уже с первых недель беременности и остается повышенной до родов [Meggyes et al. 2014; Enninga et al., 2018; Boron et al., 2022; Pelech et al., 2023]. Так в работе E.A.L. Enninga с соавторами показано, что уже на 8 неделе беременности уровень галектина-9 в периферической крови в три раза выше, чем у небеременных (8 неделя беременности – 1 976 пг/мл; у небеременных – 773 пг/мл), и такой уровень сохраняется до родов [Enninga et al., 2018]. При этом беременные женщины, вынашивающие мужской плод, имеют более высокие концентрации галектина-9 в периферической крови по сравнению с женщинами, которые вынашивают женский плод (2 263 пг/мл и 1 874 пг/мл, соответственно) [там же]. Данный факт дополняет наши представления о возможных причинах предрасположенности к развитию разных осложнений беременности у женщин, которые вынашивают женский и мужской плод. Другими исследователями было показано, что уровень галектина-9 нарастает в периферической крови пропорционально сроку беременности [Meggyes et al., 2014].

В исследовании D.G. Boron с соавторами также выявлялись более высокие значения концентрации галектина-9 в периферической крови (14 760 пг/мл) перед родами (30 неделя беременности) по сравнению с ранее описанными исследованиями [Boron et al., 2022]. В работе A. Pelech с соавторами показано, что концентрация галектина-9 в периферической крови (7 800 пг/мл) перед родами (39 неделя беременности) позитивно коррелирует с индексом массы тела и количеством жировой ткани, однако взаимосвязи с полом плода данные авторы не выявили [Pelech et al., 2023]. По-видимому, различия в определении концентрации галектина-9 в работах разных авторов в определенные сроки беременности обусловлены индивидуальными особенностями обследуемых, определением срока беременности и методами анализа, что требует проведения дальнейших исследований. Следует отметить, что иммуномодулирующая активность галектина-9 напрямую зависит от концентрации этого лектина. Так, в концентрациях, значительно превышающих его уровень при беременности, галектин-9 стимулирует синтез провоспалительного цитокина INF-гамма NK-клетками, тогда как в концентрациях, характерных для беременности, оказывает обратный эффект [Gleason et al., 2012]. У женщин со спонтанными абортными и другими патологиями беременности продукция галектина-9 клетками трофобласта и его уровень в периферической крови значительно снижается [Wu et al., 2015; Boron et al., 2022].

В целом, можно заключить, что галектин-9 играет важную роль в регуляции иммунореактивности организма при различных состояниях.

Структура рецептора Tim-3, механизмы сигнальной трансдукции

Основным лигандом для галектина-9 на NK-клетках является молекула Tim-3, которая экспрессируется на большинстве клеток иммунной системы: NK-клетках, CD4⁺ и CD8⁺T-лимфоцитах, В-лимфоцитах, Treg, натуральных T-клетках с функциями NK(NKT), моноцитах, макрофагах, тучных и дендритных клетках [Ndhlovu et al., 2012; Sun et al., 2016; Li et al., 2016].

NK-клетки конститутивно экспрессируют молекулы Tim-3, которые рассматривают как маркер их активации и созревания [Ndhlovu et al., 2012; Gleason et al., 2012; So et al., 2019], причем среди

лимфоцитов NK-клетки имеют наибольшую экспрессию Tim-3 [Gleason et al., 2012; Ndhlovu et al., 2012]. У здоровых людей цитотоксические CD56^{dim}CD16⁺NK-клетки как более зрелые демонстрируют повышенную экспрессию Tim-3 по сравнению с менее зрелыми регуляторными CD56^{bright}CD16⁻NK-клетками [Ndhlovu et al., 2012]. В работе Ndhlovu с соавторами убедительно показано, что повышение экспрессии Tim-3 под влиянием IL-15 коррелирует с созреванием и трансформацией CD56^{bright}CD16⁻NK в CD56^{dim}CD16⁺NK [там же].

В отличие от T-лимфоцитов, Tim-3-позитивные NK-клетки не являются истощенными или анергичными, а проявляют высокую функциональную активность в ответ на активирующие стимулы [там же]. Так, стимуляция NK-клеток цитокинами и их комбинациями (IL-12, IL-18, IL-12+IL-18, IL-15, IL-15+IL-12, IL-2) за исключением INF-гамма, связывание CD16 с Fc-фрагментами иммуноглобулинов, повышает экспрессию Tim-3 на обеих субпопуляциях NK-клеток [там же], что коррелирует с увеличением экспрессии транскрипционного фактора T-bet, который отвечает за дифференцировку наивных T-лимфоцитов в T-хелперы 1-го типа (T-box expressed in T-cells) [Gleason et al., 2012; So et al., 2019].

Tim-3 относится к гликопротеиновым рецепторам и имеет мембранную и растворимую форму [Chen et al., 2023]. Молекула Tim-3 включает экстрацеллюлярный, трансмембранный и интрацеллюлярный участки [там же]. Экстрацеллюлярный N-терминальный участок состоит из варибельного иммуноглобулинового и гликозилированного муцинового доменов [там же]. Муциновый участок обогащен серином и треонином [там же]. Цитоплазматический C-терминальный домен содержит остатки тирозина, фосфорилирование которых играет критическую роль во внутриклеточной трансдукции сигнала [там же].

Галектин-9 взаимодействует с варибельным иммуноглобулиновым доменом Tim-3 [там же]. Следует отметить, что сигналинг с Tim-3 изучен, главным образом, на T-лимфоцитах. В состоянии покоя интрацеллюлярный домен рецептора Tim-3 связан с протеином Bat3 (human leukocyte antigen B-associated transcript 3) [там же]. После взаимодействия Tim-3 с галектином-9 тирозиновая протеинкиназа ИТК (interleukin-2-inducible T-cell kinase) запускает фосфорилирование остатков тирозина, что приводит к диссоциации Bat3 от интрацеллюлярного домена и запускает инфлюкс кальция в клетку, вызывая апоптоз Th1-лимфоцитов [Ocana-Guzman, Torre-Bouscoulet, Sada-Ovalle, 2016]. Лишь в единичных работах показано, что в NK-клетках трансдукция сигнала с Tim-3 активирует MAPK (mitogen-activated protein kinase) и ERK (extracellular signal-regulated kinase) -сигнальные пути и вызывает деградацию IκBα – ингибитора для транскрипционного фактора NF-κB [Gleason et al., 2012]. Другими авторами показано, что регуляторные эффекты галектин-9-Tim-3-сигналинга на NK-клетках зависят от JNK- и AKT-сигнальных путей и могут быть реализованы путем регуляции активности транскрипционных факторов Id2, Blimp-1, Gata-3 и Eomes [Li et al., 2017].

В большинстве работ убедительно показано, что взаимодействие галектина-9 с Tim-3 на NK-клетках угнетает их цитотоксичность, ограничивает продукцию провоспалительных цитокинов INF-гамма, фактора некроза опухоли-альфа (TNF-альфа), синтез и секрецию перфорина и гранзима [Sun et al., 2016; Li et al., 2016, 2017]. В экспериментах по изучению фибросаркомы у мышей показано, что в присутствии галектин-9-экспрессирующих дендритных клеток NK-клетки проявляют повышенную цитотоксическую активность к опухолевым клеткам, оцениваемую по продукции INF-гамма, перфорина и гранзима [Nagahara et al., 2008]. Ранее были описаны примеры зависимости направленности иммунорегуляторных эффектов от концентрации галектина-9 [Gleason et al., 2012]. Таким образом, плейотропность регуляторных эффектов при активации галектин-9/Tim-3-сигнального пути объясняется многообразием вовлекаемых каскадов вторичных мессенджеров в разных типах клеток, а также условиями активации и факторами микроокружения.

В циркуляции присутствует также растворимая форма (s)Tim-3 [Grossman et al., 2021]. Предполагается, что это продукт деградации мембранной формы рецептора под действие металлопротеиназ [там же]. sTim-3 конкурирует с мембранным рецептором за связывание с галектином-9 [там же]. sTim-3 участвует в регуляции цитотоксичности CD8⁺T-лимфоцитов и NK-клеток [Lu et al., 2021]. Уровень sTim-3 повышается при беременности по сравнению с небеременными [Wu et al., 2015; Grossman et al., 2021], что ассоциируется с повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов (INF-гамма и TNF-альфа) и снижением продукции IL-4 и IL-10 [Tang, Rangachari, Kuchroo, 2019]. Таким образом, предполагают, что sTim-3 участвует в поддержании баланса между про- и противовоспалительными иммунными реакциями у беременных женщин.

Tim-3 также является рецептором для фосфатидилсерина, который также связывается с его иммуноглобулиновым доменом [Chen et al., 2023]. Известно, что этот сигнальный путь участвует в регуляции фагоцитарной активности моноцитов, макрофагов, дендритных клеток при клиренсе апоптозирующих клеток [Ocana-Guzman, Torre-Bouscoulet, Sada-Ovalle, 2016; Chen et al., 2023]. Известны и другие лиганды для Tim-3 [Zhu et al., 2005; Wu et al., 2015].

Дизрегуляция экспрессии Tim-3 ассоциируется с развитием аутоиммунных, инфекционных, аллергических, онкологических заболеваний, отторжением трансплантатов [Wang et al., 2008; Han et al., 2013]. При различных типах солидных опухолей экспрессия Tim-3 в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах сопряжена с плохим прогнозом и низкой выживаемостью. При аутоиммунных патологиях экспрессия Tim-3 является маркером тяжести заболевания и эффективности проводимой терапии [Chen et al., 2023].

Галектин-9 также может взаимодействовать с другими мембранными рецепторами (CD137, CD44, PD-1 (programmed cell death protein 1)), некоторыми молекулами адгезии и внутриклеточными молекулами [Chen et al., 2023]. Показано, что взаимодействие галектина-9 с PD-1-рецептором, также, как и с $\beta 3$ -интегрином (CD61) на CD4-лимфоцитах, способствует проникновению ВИЧ в клетки [Elahi et al., 2012], тогда как галектин-9/Tim-3-сигналинг уменьшает чувствительность CD4-лимфоцитов к проникновению ВИЧ, поскольку угнетает экспрессию корецепторов CXCR4, CCR-5, необходимых для проникновения вируса в клетку и репликацию его в клетке [там же].

В целом можно заключить, что галектин-9-Tim-3-сигнальный путь является важнейшим регуляторным механизмом для большинства клеток иммунной системы. На сегодняшний день молекула Tim-3 рассматривается как одна из перспективных мишеней в иммунотерапии, о чем свидетельствует увеличение количества клинических исследований с применением ингибиторов Tim-3 при различных патологиях.

Галектин-9/Tim-3-опосредованная регуляция функций НК-клеток в аспекте беременности

НК-клетки относятся к лимфоидным клеткам врожденного иммунитета. Популяция НК-клеток периферической крови гетерогенна. Большая часть НК-клеток периферической крови обладает выраженной цитотоксической активностью и имеет фенотип CD16⁺CD56^{dim}NK (до 90%). Регуляторные CD16⁺CD56^{bright}NK составляют менее 10% от общего числа НК-клетки. В исследованиях последних лет описывают также минорную субпопуляцию цитотоксических НК-клеток с фенотипом CD16⁺CD56^{bright}NK, которые характеризуются как истощенные [Cocker et al., 2022, Orlova et al., 2023a]. НК-клетки периферической крови распознают вирусинфицированные, опухолевые, поврежденные клетки собственного организма, чужеродные клетки и лизируют их путем контактного взаимодействия (Fas-Fas-L, PD-PD-L) и индукции апоптоза, секретирова гранулы, содержащие литические продукты (перфорин, гранзимы) [Erlebacher et al., 2013].

В процессе беременности плацента продуцирует большое количество гормонов и других биологически активных соединений, что приводит к изменению гормонального фона, метаболизма, иммунореактивности организма матери, необходимых для успешного протекания беременности и родов. При этом количество НК-клеток периферической крови существенно не меняется [Li et al., 2017; Orlova et al., 2023a], но уровень цитотоксических НК-клеток и их функциональная активность снижаются, а число регуляторных НК-клеток, напротив, увеличивается [там же]. По результатам мета-анализа имеющихся в литературе данных женщины с высоким риском спонтанных аборт и бесплодием характеризуются увеличением количества НК-клеток в периферической крови и избыточной продукцией провоспалительных цитокинов (IFN-гамма, TNF-альфа) [Miko et al., 2013; Li et al., 2016], тогда как уровень регуляторных НК-клеток является маркером благополучного исхода беременности [Li et al., 2016; Dixit, Karande, 2020].

Регуляторные НК-клетки периферической крови на ранних сроках беременности мигрируют в зону фетоплацентарного контакта, где трансформируются в децидуальные, которые являются основными эффекторами формирования неспецифической иммунной толерантности на границе раздела мать-плод, а также выполняют фетотрофическую функцию [Koorman et al., 2003; Cerdeira et al., 2013; Fu et al., 2017; Song Yan, 2022]. Они обнаруживаются в непосредственной близости к спиральным артериям плаценты, и, продуцируя факторы роста сосудов (vascular endothelial growth factor (VEGF), инсулиноподобного фактора роста (insulin-like growth factor-binding protein 1, IGFBP-1), плацентарного фактора роста (placental growth factor, PLGF), плейотропина, моделируют рост спиральных артерий и инвазию [там же]. Децидуальные НК-клетки путем контактного взаимодействия и секреции толерогенных цитокинов (TGF-бета1, IL-10) индуцируют формирование адаптивных (индуцибельных) iTreg из наивных CD4⁺T-лимфоцитов, препятствуя образованию регуляторных T-лимфоцитов, продуцирующих IL-17 (Th17), которые активируют провоспалительные клеточно-опосредованные реакции [Fu et al., 2017]. Treg также подавляют цитотоксические реакции против трофобласта в зоне фетоплацентарного контакта [Koorman et al., 2003; Cerdeira et al., 2013; Fu et al., 2017; Song Yan et al., 2022]. Хотя в случае инфекции децидуальные CD56^{bright}NK сохраняют способность развивать цитотоксический ответ против патогенов и выполнять защитную функцию [Crespo et al., 2020]. Провоспалительные цитокины IFN-gamma и TNF-alpha, которые продуцируются децидуальными НК-клетками при физиологически протекающей беременности, также участвуют в ангиогенезе [Erlebacher et al., 2013]. Однако при спонтанных абортах доля децидуальных НК-клеток, продуцирующих IFN-gamma и TNF-альфа, увеличивается, что

свидетельствует о важной роли этих клеток в регуляции иммунореактивности. Поэтому изучение принципов регуляции функциональной активности НК-клеток значимо для понимания механизмов формирования иммунной толерантности, реализуемых организмом как для сохранения беременности, так и при развитии онкологических процессов, трансплантации тканей.

При беременности Tim-3 экспрессируется на всех субпопуляциях НК-клеток периферической крови: регуляторных CD16⁺CD56^{bright}NK, цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK, цитотоксических истощенных CD16⁺CD56⁺NK и децидуальных NK [Li et al., 2016; Orlova et al., 2023b]. При этом в I триместре беременности экспрессия Tim-3 увеличивается в периферической крови только на регуляторных NK (CD16⁺CD56^{bright}), а в III триместре – на всех субпопуляциях НК-клеток [Orlova et al., 2023a]. В работах других авторов показано, что цитотоксические CD56^{dim}NK-клетки периферической крови демонстрируют повышенную экспрессию Tim-3 по сравнению с CD56^{bright}NK в ранние сроки беременности [Li et al., 2016]. На децидуальных NK-клетках экспрессия Tim-3 также увеличивается в ранние сроки беременности [там же].

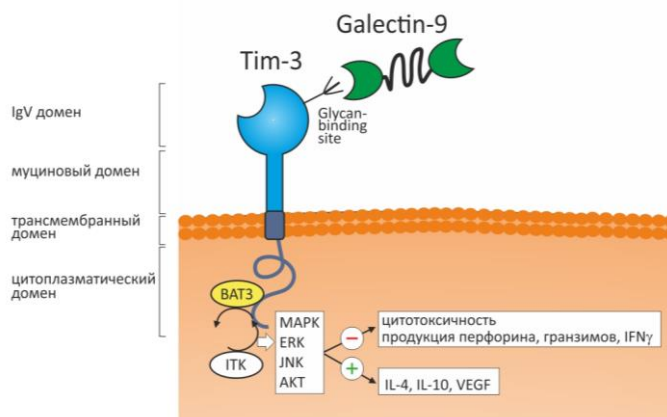
Галектин-9/Tim-3-сигналинг играет критическую роль в регуляции функций НК-клеток, включая дегрануляцию, цитотоксичность, выработку про- и противовоспалительных цитокинов, ангиогенных факторов при беременности [Gleason et al., 2012; Ndhlovu et al., 2012; Sun et al., 2016; Li et al., 2016]. Tim-3⁺NK и Tim-3⁻NK беременных имеют разный цитокиновый профиль. Tim-3⁺NK-клетки продуцируют преимущественно противовоспалительные цитокины (TGF-бета 1, IL-10 и IL-4), и в незначительных количествах INF-гамма и TNF-альфа [Meggyes et al. 2014; Li et al., 2016]. Tim-3⁺NK периферической крови по сравнению с Tim-3⁻NK имеют сниженную цитотоксическую активность по отношению к клеткам трофобласта и способны эффективно индуцировать пролиферацию Treg [там же]. Tim-3-позитивные децидуальные NK также проявляют толерогенные свойства, а именно продуцируют противовоспалительные цитокины (TGF-бета1, IL-10 и IL-4) и факторы роста сосудов, но в незначительных количествах TNF-альфа и перфорин [Li et al., 2016].

В исследованиях *in vitro* были изучены механизмы иммуномодулирующей активности галектина-9 в отношении НК-клеток. Показано, что инкубация НК-клеток, выделенных из периферической крови небеременных, с галектином-9 в концентрации, характерной для беременности, снижает процент цитотоксических CD16⁺CD56^{dim}NK в культурах, но не влияет на число регуляторных CD16⁺CD56^{bright}NK и цитотоксических истощенных CD16⁺CD56⁺NK клеток [Orlova et al., 2023b]. При этом галектин-9 увеличивает процент Tim-3-позитивных регуляторных клеток CD16⁺CD56^{bright}NK и не влияет на количество цитотоксических Tim-3-позитивных CD16⁺CD56^{dim}NK и CD16⁺CD56⁺NK-клеток [Orlova et al., 2023b]. Внесение Tim-3-блокирующих антител отменяло эффекты галектина-9 на трансформацию фенотипа и экспрессию Tim-3 в разных субпопуляциях НК [Orlova et al., 2023b]. Другими авторами также было показано, что галектин-9 влияет на формирование регуляторного фенотипа децидуальных NK, повышая экспрессию Tim-3 на них [Sun et al., 2016; Li et al., 2016]. Суммируя все вышесказанное можно заключить, что при беременности модулирующие эффекты галектина-9 реализуются, главным образом, через Tim-3-зависимые механизмы.

Помимо этого, показано, что Th2-цитокины – IL-4, а также низкие концентрации прогестерона, характерные для первого триместра беременности, эффективно усиливают экспрессию Tim-3 на НК-клетках периферической крови, вовлекая сигналинг с участием STAT6 транскрипционного фактора [Li et al., 2016]. Эстрадиол и хорионический гонадотропин в концентрациях, характерных для разных триместров беременности, подобных эффектов не оказывали [там же]. Хотя в наших исследованиях показано, что инкубация НК периферической крови небеременных женщин *in vitro* с гормонами, продуцируемыми плацентой (эстрадиол, эстриол, прогестерон, хорионический гонадотропин, лептин, грелин, киспептин), в концентрациях, характерных для разных триместров беременности, эффективно влияет на трансформацию фенотипа, экспрессию молекул клеточной адгезии, продукцию перфорина и гранзима, цитокинов, а также регуляторных микро-РНК [Shirshv et al., 2017a,b; Orlova et al., 2023a,b,c]. По-видимому, гормонозависимые механизмы в Tim-3-опосредованной регуляции функций НК-клеток при беременности будут изучены в ближайшем будущем.

В исследованиях многих авторов убедительно показано, что концентрация галектина-9 и количество Tim-3-позитивных НК-периферической крови являются важным прогностическим маркером развития патологий беременности. Так, у женщин со спонтанными абортами количество Tim-3⁺NK снижается, а цитотоксичность и продукция провоспалительных цитокинов НК-клетками, напротив, увеличивается [Miko et al., 2013]. При проведении экспериментах на мышах убедительно показано, что блокада Tim-3 способствует резорбции плода, снижению количества Tim-3⁺NK-клеток периферической крови и нарушению их регуляторной функции, а адоптивный перенос Tim-3⁺NK-клеток, напротив, снижает частоту выкидышей [Li et al., 2016]. Суммируя вышеописанные данные литературы, можно заключить, что галектин-9 регулирует экспрессию молекулы Tim-3 и формирование регуляторного фенотипа НК-клеток как *in vivo*, так и *in vitro*, а галектин-9-Tim-3-сигналинг необходим для созревания НК-клеток и

играет важную роль в сохранении и успешном протекании беременности. Молекулярные механизмы галектин-9/Tim-3-регуляции функций НК-клеток в аспекте беременности представлены на рисунке



Молекулярные механизмы галектин-9/Tim-3-регуляции функций НК-клеток при беременности [Molecular mechanisms of Galectin-9/Tim-3-regulation of functional activity of natural killers during pregnancy]

Из схемы видно, что галектин-9 (Galectin-9) взаимодействует с гликан-связывающим сайтом (Glycan-binding site) варибельного иммуноглобулинового домена (IgV) рецептора Tim-3 на НК-клетках. Молекула Tim-3 включает экстрацеллюлярный (IgV и муциновый домены), трансмембранный и интрацеллюлярный участки. В состоянии покоя интрацеллюлярный домен рецептора Tim-3 связан с протеином Bat3 (human leukocyte antigen B-associated transcript 3). После взаимодействия Tim-3 с галектином-9 тирозиновая протеинкиназа ITK (interleukin-2-inducible T-cell kinase) запускает фосфорилирование остатков тирозина, что приводит к диссоциации Bat3 от интрацеллюлярного домена. Трансдукция сигнала с Tim-3 активирует MAPK (mitogen-activated protein kinase) и ERK (extracellular signal-regulated kinase) -сигнальные пути. Другими авторами показано, что регуляторные эффекты галектин-9-Tim-3-сигналинга на НК-клетках зависят от JNK- и AKT-сигнальных путей и могут быть реализованы путем регуляции активности транскрипционных факторов Id2, Blimp-1, Gata-3 и Eomes. При физиологически протекающей беременности галектин-9/Tim-3-сигналинг способствует формированию толерогенного фенотипа НК-клеток, снижая их цитотоксичность, ограничивая дегрануляцию и выброс литических факторов (перфоринов и гранзимов) и провоспалительного цитокина INF-гамма (INF γ), способствуя продукции противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10) и ангиогенных факторов VEGF (vascular endothelial growth factor).

Заключение

В целом, можно заключить, что галектин-9/Tim-3-сигналинг играет ключевую роль в регуляции функций НК-клеток. Направленность иммунорегуляторных эффектов галектина-9 на НК-клетки, реализуемых через Tim-3-рецептор, зависит от концентрации лектина, активационных стимулов, факторов микроокружения. При физиологически протекающей беременности галектин-9/Tim-3-сигналинг способствует формированию толерогенного фенотипа НК-клеток, снижая их цитотоксичность, ограничивая дегрануляцию и выброс литических факторов (перфоринов и гранзимов), способствуя продукции противовоспалительных цитокинов и пролиферации Treg, что необходимо для успешного протекания и сохранения беременности. Модулирование Tim-3-сигналинга на НК-клетках представляет новый терапевтический подход, перспективный не только для преодоления патологий беременности, но также и для лечения хронических вирусных, онкологических, аутоиммунных заболеваний.

Список источников

1. Рапопорт Е.М., Бовин Н.В. Специфичность галектинов человека в составе клеток // Биохимия. 2015. Т. 80, № 7. С. 1010–1022.
2. Рапопорт Е.М., Курмышкина О.В., Бовин Н.В. Галектины млекопитающих: структура, углеводная специфичность и функции // Биохимия. 2008. Т. 73, № 4. С. 483–497.

3. Asakura H. et al. Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9 // *J. Immunol.* 2002. Vol. 169. P. 5912–5918.
4. Boron D.G. et al. Galectin-1 and galectin-9 concentration in maternal serum: implications in pregnancies complicated with preterm prelabor rupture of membranes // *J. of clin. Med.* 2022. Vol. 11, № 21. P. 6330.
5. Cerdeira A.S., et al. Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors // *J. of immunol.* 2013. Vol. 190, № 8. P. 3939–3948.
6. Chen H. et al. T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3): Solving a key puzzle in autoimmune diseases // *Intern. immunopharmacol.* 2023. Vol. 121, P. 110418.
7. Cocker A.T.H. et al. CD56-negative NK cells: frequency in peripheral blood, expansion during HIV-1 infection, functional capacity and KIR expression. // *Front Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 992723.
8. Crespo A.C., et al. Decidual NK cells transfer granulysin to selectively kill bacteria in trophoblasts // *Cell.* 2020. Vol. 182, № 5. P. 1125–1139.
9. Dixit A., Karande A.A. Glycodelin regulates the numbers and function of peripheral natural killer cells // *J. of reprod. Immunol.* 2020. Vol. 137. P. 102625.
10. Elahi S. et al. Galectin-9 binding to tim-3 renders activated human CD4⁺ T cells less susceptible to HIV-1 infection // *Blood.* 2012. Vol. 119, № 18. P. 4192–204.
11. Enninga E.A.L. et al. Immune checkpoint molecules soluble program death ligand 1 and galectin-9 are increased in pregnancy // *Am. J. of reprod. immunol.* 2018. Vol. 79, № 2. e12795.
12. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface // *Annu. Rev. Immunol.* 2013. Vol. 31. P. 387–411.
13. Fu B. et al. Natural killer cells promote fetal development through the secretion of growth-promoting factors // *Immunity.* 2017. Vol. 47, № 6. P. 1100–1113.
14. Fuselier C. et al. Placental galectins in cancer: why we should pay more attention // *Cells.* 2023. Vol. 12, № 3. P. 437.
15. Gleason M.K. et al. Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9 // *Blood.* 2012. Vol. 119, № 13. P. 3064–3072.
16. Grossman T.B. et al. Soluble T cell immunoglobulin mucin domain 3 (sTim-3) in maternal sera: a potential contributor to immune regulation during pregnancy // *The J. of maternal-fetal & neonatal medicine: the official J of the Europ. Associat. of Perinat. Med.* 2021. Vol. 34, № 24. P. 4119–4122.
17. Han G. et al. Tim-3: an activation marker and activation limiter of innate immune cells // *Front Immunol.* 2013. Vol. 4. P. 449–455.
18. Imaizumi T. et al. Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells // *J. Leukoc. Biol.* 2002. Vol. 72. P. 486–491.
19. Iwasaki-Hozumi H. et al. Blood levels of galectin-9, an immuno-regulating molecule, reflect the severity for the acute and chronic infectious diseases // *Biomolecules.* 2021. Vol. 11, № 3. P. 430.
20. Koopman L.A. et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential // *The J. of exp. medicine.* 2003. Vol. 198, № 8. P. 1201–1212.
21. Li Y. et al. The Galectin-9/Tim-3 pathway is involved in the regulation of NK cell function at the maternal-fetal interface in early pregnancy // *Cellular & molec. Immunol.* 2016. Vol. 13, № 1. P. 73–81.
22. Li Y. et al. Tim-3 signaling in peripheral NK cells promotes maternal-fetal immune tolerance and alleviates pregnancy loss // *Science signaling.* 2017. Vol. 10, № 498. eaah4323.
23. Lu C. et al. An emerging role of TIM3 expression on T cells in chronic kidney inflammation // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 798683.
24. Meggyes M. et al. Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8⁺T cells throughout pregnancy: TIM-3/Galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 3. e92371.
25. Miko E. et al. Involvement of Galectin-9/TIM-3 Pathway in the Systemic Inflammatory Response in Early-Onset Preeclampsia // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, № 8. e71811.
26. Nagahara K. et al. Galectin-9 increases Tim-3 dendritic cells and CD8 T cells and enhances anti-tumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions // *J. Immunol.* 2008. Vol. 181, № 11. P. 7660–7669.
27. Ndhlovu L.C. et al. Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity // *Blood.* 2012. Vol. 119, № 16. P. 3734–3743.
28. Ocana-Guzman R., Torre-Bouscoulet L., Sada-Ovalle I. TIM-3 regulates distinct functions in macrophages // *Front. Immunol.* 2016. Vol. 13, № 7. P. 229.
29. Orlova E.G. et al. Expression of TIM-3 and CD9 molecules on natural killer cells (NK) and T-lymphocytes with NK functions (NKT) in the peripheral blood at different trimesters of physiological pregnancy // *J. Evol. Biochem. Phys.* 2023a. Vol. 59, P. 809–821.
30. Orlova E.G. et al. Galectin-9 influences the Tim-3 molecule expression in natural killer different subpopulations // *Med. Immunol. (Russia).* 2023b. Vol. 25, № 3. P. 469–476.
31. Orlova E.G. et al. Hormone-Dependent Reprogramming of NK Cell Functions in the Aspect of Pregnancy // *Science and Global Challenges of the 21st Century – Innovations and Technologies in Interdisciplinary Applications. Perm Forum 2022. Lecture Notes in Networks and Systems.* 2023c. Vol. 622. Springer, Cham.

32. Pelech A. et al. Do Serum galectin-9 levels in women with gestational diabetes and healthy ones differ before or after delivery? A pilot study // *Biomolecules*. 2023. Vol. 13, № 4. P. 697.
33. Sanchez-Fueyo A. et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and allo- immune responses and promotes immunological tolerance // *Nat. Immunol.* 2003. Vol. 4, № 11. P. 1093–1101.
34. Shirshv S.V. et al. Hormonal regulation of NK cell cytotoxic activity // *Dokl. Biol. Sci.* 2017b. Vol. 472, № 1. P. 28–30.
35. Shirshv S.V. et al. MicroRNA in hormonal mechanisms of regulation of NK cell function // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2017a. Vol. 474, № 1. P. 168–172.
36. So E.C. et al. NK cell expression of Tim-3: first impressions matter // *Immunobiology*. 2019. Vol. 224, № 3. P. 362–370.
37. Song Yan et al. The mTORC1 signaling support cellular metabolism to dictate decidual NK cells function in early pregnancy // *Front Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 771732.
38. Sun J. et al. Tim-3 is up regulated in NK cells during early pregnancy and inhibits NK cytotoxicity toward trophoblast in galectin-9 dependent pathway // *PloS one*. 2016. Vol. 11, № 1. e0147186.
39. Tang R., Rangachari M., Kuchroo V.K. Tim-3: A co-receptor with diverse roles in T cell exhaustion and tolerance // *Semin. Immunol.* 2019. Vol. 42. P. 101302.
40. Wang F. et al. Activation of Tim-3–Galectin-9 pathways improves survival of fully allergenic skin grafts // *Transpl. Immunol.* 2008. Vol. 19, № 1. P. 12–19.
41. Wu M. et al. Soluble co stimulatory molecule sTim3 regulates the differentiation of Th1 and Th2 in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. Vol. 8, № 6. P. 8812–8819.
42. Zhu C. et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity // *Nat. Immunol.* 2005. Vol. 6, № 12. P. 1245–1252.
43. Zhu W. et al. Tim-3: An inhibitory immune checkpoint is associated with maternal-fetal tolerance and recurrent spontaneous abortion // *Clin. Immunol.* 2022. Vol. 245. P. 109185.

References

1. Rapoport E.M., Bovin N.V. [Specificity of human galectins on cell surfaces]. *Biohimiya*. V. 80, No. 7 (2015): pp. 846-56. (In Russ.)
2. Rapoport E.M., Kurmyshkina O., Bovin N.V. [Mammalian galectins: structure, carbohydrate specificity, and functions]. *Biohimiya*. V. 73, No. 4 (2008): pp. 393-405. (In Russ.)
3. Asakura H. et al. Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9. *J. Immunol.* V. 169 (2002): pp. 5912-5918.
4. Boron D.G. et al. Galectin-1 and galectin-9 concentration in maternal serum: implications in pregnancies complicated with preterm prelabor rupture of membranes. *J. of clin. med.* V. 11(21) (2022): pp. 6330.
5. Cerdeira A.S., et al. Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. *J. of immunol.* V. 190(8) (2013): pp. 3939-3948.
6. Chen H. et al. T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3): Solving a key puzzle in autoimmune diseases. *Intern. immunopharmacol.* V. 121 (2023): pp. 110418.
7. Cocker A.T.H. et al. CD56-negative NK cells: frequency in peripheral blood, expansion during HIV-1 infection, functional capacity and KIR expression. // *Front Immunol.* 2022. Vol.13, P. 992723.
8. Crespo A.C., et al. Decidual NK cells transfer granulysin to selectively kill bacteria in trophoblasts. *Cell.* V. 182 (5) (2020): pp. 1125-1139.
9. Dixit A., Karande A.A. Glycodelin regulates the numbers and function of peripheral natural killer cells. *J. of reprod. Immunol.* V. (137) (2020): pp. 102625.
10. Elahi S. et al. Galectin-9 binding to tim-3 renders activated human CD4⁺T cells less susceptible to HIV-1 infection. *Blood*. V. 119(18) (2012): pp. 4192-204.
11. Enninga E.A.L. et al. Immune checkpoint molecules soluble program death ligand 1 and galectin-9 are increased in pregnancy. *Am. J. of reprod. Immunol.* V. 79(2) (2018): e12795.
12. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu. Rev. Immunol.* V. 31 (2013): pp. 387-411.
13. Fu B. et al. Natural killer cells promote fetal development through the secretion of growth-promoting factors. *Immunity*. V. 47(6) (2017): pp. 1100–1113.
14. Fuselier C. et al. Placental galectins in cancer: why we should pay more attention. *Cells*. V. 12(3) (2023): pp. 437.
15. Gleason M.K. et al. Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood*. V. 119(13) (2012): pp. 3064-72.
16. Grossman T.B. et al. Soluble T cell immunoglobulin mucin domain 3 (sTim-3) in maternal sera: a potential contributor to immune regulation during pregnancy. *The J. of maternal-fetal & neonatal medicine: the official J of the Europ. Associat. of Perinat. Med.* V. 34(24) (2021): pp. 4119-4122.

17. Han G. et al. Tim-3: an activation marker and activation limiter of innate immune cells. *Front Immunol.* V. 4 (2013): pp. 449-455.
18. Imaizumi T. et al. Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* V. 72 (2002): pp. 486-491.
19. Iwasaki-Hozumi H. et al. Blood levels of galectin-9, an immuno-regulating molecule, reflect the severity for the acute and chronic infectious diseases. *Biomolecules.* V. 11(3) (2021): pp. 430.
20. Koopman L.A. et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *The J. of exp. medicine.* V. 198(8) (2003): pp. 1201-1212.
21. Li Y. et al. The Galectin-9/Tim-3 pathway is involved in the regulation of NK cell function at the maternal-fetal interface in early pregnancy. *Cellular & mol. Immunol.* V. 13(1) (2016): pp. 73-81.
22. Li Y. et al. Tim-3 signaling in peripheral NK cells promotes maternal-fetal immune tolerance and alleviates pregnancy loss. *Science signaling.* V. 10(498) (2017): eaah4323.
23. Lu C. et al. An emerging role of TIM3 expression on T cells in chronic kidney inflammation. *Front. Immunol.* V. 12 (2021): pp. 798683.
24. Meggyes M., et al. Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8⁺T cells throughout pregnancy: TIM-3/Galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy. *PLoS One.* V. 9(3) (2014): e92371.
25. Miko E. et al. Involvement of Galectin-9/TIM-3 Pathway in the Systemic Inflammatory Response in Early-Onset Preeclampsia. *PLoS One.* V. 8(8) (2013): e71811.
26. Nagahara K. et al. Galectin-9 increases Tim-3 dendritic cells and CD8 T cells and enhances anti-tumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions. *J. Immunol.* V. 181(11) (2008): pp. 7660-7669.
27. Ndhlovu L.C. et al. Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood.* V. 119(16) (2012): pp. 3734-43.
28. Ocana-Guzman R., Torre-Bouscoulet L., Sada-Ovalle I. TIM-3 regulates distinct functions in macrophages. *Front. Immunol.* V. 13(7) (2016): pp. 229.
29. Orlova E.G. et al. Expression of TIM-3 and CD9 molecules on natural killer cells (NK) and T-lymphocytes with NK functions (NKT) in the peripheral blood at different trimesters of physiological pregnancy. *J. Evol. Biochem. Phys.* V. 59 (2023a): pp. 809-821.
30. Orlova E.G. et al. Galectin-9 influences the Tim-3 molecule expression in natural killer different subpopulations. *Med. Immunol. (Russia).* V. 25(3) (2023b): pp. 469-476.
31. Orlova E.G. et al. Hormone-Dependent Reprogramming of NK Cell Functions in the Aspect of Pregnancy. *Science and Global Challenges of the 21st Century – Innovations and Technologies in Interdisciplinary Applications. Perm Forum 2022. Lecture Notes in Networks and Systems.* Springer, Cham. (2023c): V. 622.
32. Pelech A. et al. Do Serum galectin-9 levels in women with gestational diabetes and healthy ones differ before or after delivery? A pilot study. *Biomolecules.* V. 13(4) (2023): pp. 697.
33. Sanchez-Fueyo A. et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and allo- immune responses and promotes immunological tolerance. *Nat. Immunol.* V. 4(11) (2003): pp. 1093-1101.
34. Shirshov S.V. et al. Hormonal regulation of NK cell cytotoxic activity. *Dokl Biol Sci.* V. 472(1) (2017b): pp. 28-30.
35. Shirshov S.V. et al. MicroRNA in hormonal mechanisms of regulation of NK cell function. *Dokl Biochem Biophys.* V. 474(1) (2017a): pp. 168-172.
36. So E.C. et al. NK cell expression of Tim-3: first impressions matter. *Immunobiology.* V. 224(3) (2019): pp. 362-370.
37. Song Yan et al. The mTORC1 signaling support cellular metabolism to dictate decidual NK cells function in early pregnancy. *Front Immunol.* V. 13 (2022): pp. 771732.
38. Sun J. et al. Tim-3 is up regulated in NK cells during early pregnancy and inhibits NK cytotoxicity toward trophoblast in galectin-9 dependent pathway. *PloS one.* V. 11(1) (2016): e0147186.
39. Tang R., Rangachari M., Kuchroo V.K. Tim-3: A co-receptor with diverse roles in T cell exhaustion and tolerance // *Semin. Immunol.* 2019. Vol. 42. P. 101302.
40. Wang F. et al. Activation of Tim-3–Galectin-9 pathways improves survival of fully allergenic skin grafts. *Transpl. Immunol.* V. 19(1) (2008): pp. 12-19.
41. Wu M. et al. Soluble co stimulatory molecule sTim3 regulates the differentiation of Th1 and Th2 in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Int. J. Clin. Exp. Med.* V. 8(6) (2015): pp. 8812-8819.
42. Zhu C. et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* V. 6(12) (2005): pp. 1245–1252.
43. Zhu W. et al. Tim-3: An inhibitory immune checkpoint is associated with maternal-fetal tolerance and recurrent spontaneous abortion. *Clin. Immunol.* V. 245 (2022): pp. 109185.

Статья поступила в редакцию 23.09.2023; одобрена после рецензирования 03.10.2023; принята к публикации 20.11.2023.

The article was submitted 23.09.2023; approved after reviewing 03.10.2023; accepted for publication 20.11.2023.

Информация об авторах

Е. Г. Орлова – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции.
Старший преподаватель кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета.
О. А. Логинова – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции.
О. Л. Горбунова – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции.
С. В. Ширшев – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией иммунорегуляции.

Information about the authors

E. G. Orlova – doctor of biology, leading researcher of laboratory of immunoregulation.
Senior lecturer at the department of microbiology and immunology, faculty of biology.
O. A. Loginova – candidate of biology, junior researcher of laboratory of immunoregulation.
O. L. Gorbunova – candidate of biology, researcher of laboratory of immunoregulation.
S. V. Shirshv – doctor of medical sciences, head of laboratory of immunoregulation.

Вклад авторов:

Орлова Е. Г. – концепция исследования и написание обзора.
О. А. Логинова – оформление, доработка текста.
О. Л. Горбунова – оформление, доработка текста.
С. В. Ширшев – научное руководство, итоговые выводы.

Contribution of the authors:

Orlova E. G. – research concept and writing of the review.
O. A. Loginova – design, revision of the text.
O. L. Gorbunova – design, revision of the text.
S. V. Shirshv – scientific guidance, final conclusions.

**Вестник Пермского университета.
Серия БИОЛОГИЯ =
2023. Выпуск 4**

**Bulletin of Perm University.
BIOLOGY
2023. Issue 4**

Научное издание

Редактор *А. С. Беляева*

Корректор *Е. Г. Ефимик*

Компьютерная верстка *С. А. Овеснова и Е. Г. Ефимик*

Подписано в печать 20.11.2023. Выход в свет 14.12.2023.
Формат 60×84/8. Усл. печ. л. 13,0. Тираж 30 экз. Заказ № 1799.
Распространяется бесплатно.

Издательский центр Пермского государственного
национального исследовательского университета
614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15

Отпечатано с готового оригинал-макета в типографии издательства
Пермского национального исследовательского политехнического университета
614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, к. 113.

Подписка на журнал осуществляется онлайн на сайте агентства «Урал-Пресс»
<https://www.ural-press.ru/catalog/97266/8940022/>
Подписной индекс 41000