

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. Ишибирдин, 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, 2024

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 массовой 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, Israel
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. Mikhhev, 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. Politov, 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. Chereshnev, 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, 2024

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

Ботаника

- Ишбирдин А. Р., Аташ Пур Д., Марданишин И. С.* Адаптивные реакции надземной вегетативной сферы картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта 'Башкирский' на густоту посадки 349
- Кочубей А. В., Мальцева И. А., Мальцев Е. И., Яковиччук А. В.* Динамика эффективности фиксации CO₂ штаммом *Bracteacoccus minor* при различной доступности азота 357
- Мифтахова С. А.* Антэкологические особенности форзиций при интродукции в Ботаническом саду Института биологии Коми НЦ УрО РАН 367
- Молганова Н. А., Овеснов С. А.* *Salix alba*, *S. euxina* и *S. × fragilis* (Salicaceae) в условиях Пермского края 374

Зоология

- Загуменов М. Н., Капитонов В. И., Останина М. Г., Захарова А. А., Тимирязнова К. А.* Редкие млекопитающие Удмуртии: мониторинговый список 380

Микробиология

- Ускова С. С., Мартынова А. В.* Влияние тяжелых металлов на штаммы рода *Enterococcus* 390
- Цыганов И. В., Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г.* Дифференцированная оценка воздействия биогенных полиаминов и алармонсинтетазы Rel_{Msm} на характер скольжения бактериальных клеток *Mycobacterium smegmatis* 401
- Шаравин Д. Ю., Беляева П. Г., Цецинская Е. М., Галямина В. В.* Влияние психротолерантных метилотрофных бактерий на рост, пигментный состав и накопление белка и углеводов у микроводоросли *Chlorella vulgaris* 412

Генетика

- Марущак А. В., Торгунакова А. В., Титов Р. А., Соболева О. А., Минина В. И.* Ассоциации нарушений ядерной ДНК с индивидуальными вариантами генов системы репарации ДНК *APEX1*, *ERCC2*, *ERCC5*, *PARP1* и *hOGG1* у работников угольных теплоэлектростанций 421
- Сорокина А. В.* Молекулярно-генетический анализ гена *CYP11B2*, ассоциированного с развитием артериальной гипертензии у дзюдоистов города Перми 433
- Титов Р. А., Глушков А. Н., Торгунакова А. В., Захарова Я. А., Марущак А. В., Минина В. И.* Изучение роли полиморфизма генов репарации ДНК в формировании предрасположенности к развитию тройного негативного рака молочной железы у женщин 440

Иммунология

- Орлова Е. Г., Логинова О. А., Горбунова О. Л., Шириев С. В.* Фенотипические особенности гранулоцитов низкой плотности при физиологической беременности 451

Персоналии

- Ефимик В. Е., Есюнин С. Л.* К 100-летию Александра Степановича Уточкина 461

Contents

Botany

- Ishbirdin A. R., Atash Poor D., Mardanshin I. S.* Adaptive responses of the aboveground vegetative sphere of potato (*Solanum tuberosum* L.) variety 'Bashkirsky' to planting density 349
- Kochubey A. V., Maltseva I. A., Maltsev Ye. I., Yakoviichuk A. V.* Dynamics of CO₂ fixation efficiency by *Bracteacoccus minor* strain with different nitrogen availability 357
- Miftakhova S. A.* Anthecological features of forsythias during introduction in the Botanical Garden of the Institute of Biology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences . . . 367
- Molganova N. A., Ovesnov S. A.* *Salix alba*, *S. euxina* and *S. × fragilis* (*Salicaceae*) in the conditions of the Perm Region 374

Zoology

- Zagumenov M. N., Kapitonov V. I., Ostanina M. G., Zakharova A. A., Timirzyanova K. A.* Rare mammals of Udmurtia: monitoring list 380

Microbiology

- Uskova S. S., Martynova A. V.* The effect of heavy metals on strains of the genus *Enterococcus* 390
- Tsyganov I. V., Nesterova L. Yu. Tkachenko A. G.* Differentiated impact assessment of the biogenic polyamines and alarmon synthetase Rel_{Msm} on the sliding motility of *Mycobacterium smegmatis* 401
- Sharavin D. Y., Belyaeva P. G., Tseshchinskaya E. M., Galyamina V. V.* The effect of psychrotolerant methylotrophic bacteria on the growth, pigment content and accumulation of protein and carbohydrates in the microalgae *Chlorella vulgaris* 412

Genetics

- Marushchak A. V., Torgunakova A. V., Titov R. A., Soboleva O. A., Minina V. I.* Associations of nuclear DNA disorders with individual variants of the DNA repair system genes *APEX1*, *ERCC2*, *ERCC5*, *PARP1* and *hOGG1* in workers of coal thermal power plants 421
- Sorokina A. V.* Molecular genetic analysis of the *CYP11B2* gene associated with the development of arterial hypertension in judokas from Perm 433
- Titov R. A., Glushkov A. N., Torgunakova A. V., Zakharova Y. A., Maruschak A. V., Minina V. I.* Study of polymorphism of DNA repair genes in the formation of predisposition to the development of triple negative breast cancer in women 440

Immunology

- Orlova E. G., Loginova O. A., Gorbunova O. L., Shirshov S. V.* Phenotypic features of low-density granulocytes in physiological pregnancy 451

Personalities

- Efimik V. E., Esyunin S. L.* On the 100th anniversary of Alexander Stepanovich Utochkin 461

БОТАНИКА

Научная статья

УДК 58.084.2

EDN BРХОНТ

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-349-356



**Адаптивные реакции надземной вегетативной сферы
картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта 'Башкирский'
на густоту посадки**

**Айрат Римович Ишбирдин^{1✉}, Дорьюш Аташ Пур²,
Ильдар Салимьянович Марданшин³**

^{1,2} Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

^{1✉} ishbirdin@mail.ru

² dariushatashpoor2019@gmail.com

³ Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Уфа, Россия,
ildar.mardanshin1966@yandex.ru

Аннотация. Одним из подходов в оценке эффективности агротехнических приемов выращивания сельскохозяйственных культур является популяционный анализ с выявлением проявлений индивидуальных и популяционных стратегий жизни возделываемых растений и их сортовой специфичности. Исследования проводились в 2024 г. на базе Чишминского селекционного центра Башкирского НИИСХ. Объектом исследования был сорт 'Башкирский'. Изучали морфологическую структуру надземной вегетативной сферы и ее изменчивость в вариантах с густотой посадки 17.8, 26.7 и 53.3 тыс. клубней/га. Изучили закономерности изменчивости 11 морфологических признаков: число побегов; высота растения (наиболее развитого побега); число листьев на наиболее развитом побеге; число пар крупных долей пластинки листа; длина и ширина листа, длина черешка наиболее развитого листа срединной формации; длина и ширина пластинки наиболее развитой доли листа, индексы листа и наиболее развитой доли листа. Однофакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние густоты посадки на большинство признаков, кроме индексов листа и боковой доли листа. Установили адаптивный характер изменчивости таких признаков, как число пар и размеры боковых долей пластинки листа, проявивших, соответственно, конвергентную и дивергентную онтогенетические тактики. Выявили структуру морфологической изменчивости с выделением групп индикаторных признаков. К генотипическим (таксономическим) индикаторам отнесены признаки с низкими показателями общей и согласованной изменчивости: высота растения, число листьев, длина листа, число пар долей листа, индекс доли листа, индекс листа. К биологическим индикаторам с низкой общей и высокой согласованной изменчивостью отнесены длина и ширина доли листа и ширина листа. Высокую общую и низкую согласованную изменчивость имеют экологические индикаторы, в наибольшей степени зависящие от внешних условий, – длина черешка и число побегов. Системные индикаторы не выявлены. Предстоит изучение влияния изменчивости надземной вегетативной сферы на структуру урожая картофеля.

Ключевые слова: картофель, сорт 'Башкирский', густота посадки, изменчивость, онтогенетические тактики

Для цитирования: Ишбирдин А. Р., Аташ Пур Д., Марданшин И. С. Адаптивные реакции надземной вегетативной сферы картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта 'Башкирский' на густоту посадки // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 349–356. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-349-356>.

BOTANY

Original article

**Adaptive responses of the aboveground vegetative sphere of potato
(*Solanum tuberosum* L.) variety 'Bashkirsky' to planting density**

Ayrat R. Ishbirdin^{1✉}, Doryush Atash Poor², Ildar S. Mardanshin³

^{1,2} Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russia,

^{1✉} ishbirdin@mail.ru

² dariushatashpoor2019@gmail.com

³ Bashkir Research Institute of Agriculture, Ufa, Russia, ildar.mardanshin1966@yandex.ru

Abstract. One of the approaches to assessing the efficiency of agricultural practices in growing agricultural crops is population analysis with the identification of manifestations of individual and population life strategies of cultivated plants and their varietal specificity. The studies were conducted in 2024 at the Chishminsky Breeding Center of the Bashkir Research Institute of Agriculture. The object of the study was the ‘Bashkir’ variety. We studied the morphological structure of the aboveground vegetative sphere and its variability in variants with a planting density of 17.8; 26.7 and 53.3 thousand tubers/ha. We studied the patterns of variability of 11 morphological traits: number of shoots; plant height (the most developed shoot); number of leaves on the most developed shoot; number of pairs of large lobes of the leaf blade, leaf length and width, petiole length of the most developed leaf of the middle formation; length and width of the blade of the most developed leaf lobe, indices of leaves and the most developed leaf lobe. One-way analysis of variance revealed a reliable effect of planting density on most traits, with the exception of leaf indices and the lateral leaf lobe. The adaptive nature of variability of such traits as the number of pairs and sizes of the lateral lobes of the leaf blade, demonstrating convergent and divergent ontogenetic tactics, respectively, was established. The structure of morphological variability with the allocation of groups of indicator traits was revealed. Traits with low rates of general and coordinated variability are classified as genotypic (taxonomic) indicators: plant height, number of leaves, leaf length, number of pairs of leaf lobes, leaf lobe index, leaf index. The length and width of a leaf lobe, leaf width are classified as biological indicators with low general and high coordinated variability. High general and low coordinated variability are characteristic of ecological indicators that depend most on external conditions – petiole length and number of shoots. No systemic indicators have been identified. The influence of variability in the aboveground vegetative sphere on the structure of potato yield remains to be studied.

Keywords: potatoes, ‘Bashkirskiy’ variety, planting density, variability, ontogenetic tactics

For citation: Ishbirdin A. R., Atash Poor D., Mardanshin I. S. [Adaptive responses of the aboveground vegetative sphere of potato (*Solanum tuberosum* L.) variety ‘Bashkirsky’ to planting density]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2024): pp. 349-356. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-349-356>.

Введение

Агротехника возделывания картофеля предполагает применение широкого спектра методов повышения урожайности и управления структурой урожая (товарность, производство семенного материала): предпосевная обработка почвы, сроки посадки, способы и глубина посадки, качество семенных клубней, предпосевная обработка клубней, густота посадки, применение средств защиты растений и удобрений, а также такие не совсем традиционные приемы, как предварительное проращивания клубней, декапитация растений, удаление завязавшихся плодов [Иванова, 2011; Васильев, 2012; Владимиров, Гайнутдинов, Аппаков, 2012; Табаков, Самаркина, Шашкаров, 2013; Митрофанов и др., 2016; Дыйканова, 2017 и мн. др.]. Практически все эти агротехнические приемы прямо или косвенно направлены на оптимизацию роста и развития надземной части растений, продления сроков и эффективности фотосинтетической активности, определяемых числом и высотой побегов, площадью ассимиляционной поверхности. На развитие надземных органов картофеля и структуру урожая влияют и постоянно действующие факторы (тип почвы и ее механический состав), а также климатические и погодные условия. В связи с этим большое значение приобретают многофакторные исследования [Васильев, Бобоев, 2012], среди которых и изучение индивидуальных и популяционных стратегий жизни картофеля и их сортовой специфичности [Ишбирдин, Кливаденко, Ишмуратова, 2011; Каримова, Аташ Пур, 2024].

Объекты и методы исследований

Исследования проводились в 2024 г. на базе Чишминского селекционного центра Башкирского НИИСХ. Почвы – чернозем оподзоленный, тяжелосуглинистого механического состава. Содержание гумуса в пахотном слое – 7.4%, рН – 6.9. Объектом исследования был сорт ‘Башкирский’, созданный селекционерами Башкирского НИИ СХ и Федерального исследовательского центра картофеля имени А.Г. Лорха скрещиванием сортов ‘Белоусовский’ и гибрида 289/82-3 ФИЦ картофеля. Сорт включен в Государственный реестр селекционных достижений в 2007 г. по Уральскому региону.

Посадка картофеля проводилась 23 мая под лопату в предварительно нарезанные гребни культиватором КОН-2,8. Гребни формировали с междурядьем 75 см, расстояние между растениями – 75, 50 и 25 см соответственно, густота посадки составляла 17.8, 26.7 и 53.3 тыс. клубней/га. Измерения проведены 17 июля. Погодные условия для формирования растений до этого срока были благоприятны как для закладки, так и для накопления урожая, характеризовались умеренно положительными температурами и достаточным уровнем осадков, характерными для данной агроклиматической зоны. Удобрения вносили методом разбрасывания перед окучиванием в дозе 800 кг/га ($N_{16}P_{16}K_{16}$). Измеряли 9 признаков морфологической структуры надземных частей растения: число побегов; высоту растения (наиболее развитого побега); число листьев на наиболее развитом побеге; число пар крупных долей листа, длину и ширину листа, длину черешка наиболее развитого листа срединной формации; длину и ширину пластинки наиболее

развитой доли листа. Для оценки формы рассчитывали индексы листа и наиболее развитой доли листа как отношение длины к ширине структурной единицы. Уровень общей изменчивости оценивали по шкале С.А. Мамаева [1970]; структуру изменчивости морфологических признаков выявляли по методике Н.С. Ростовской [2002]; оценку усредненного виталитета растений в варианте опыта, построение экоклина по благоприятности условий роста проводили по методикам А.Р. Ишбирдина и М.М. Ишмуратовой [2004]; онтогенетические тактики (характер изменения вариабельности признака на экокLINE по направлению ухудшения условий роста) определяли по методике Ю.А. Злобина [1989] с изменениями [Методика..., 2020]. Для оценки значимости влияния факторов на формирование признака оценивалась достоверность различий средних по критерию Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ. Данные обрабатывались в программах Microsoft Office Excel 2007 и STATISTICA 12.

Результаты и их обсуждение

Фенотипическая изменчивость является общим свойством живых организмов меняться в определенных генотипом пределах (норма реакции). В отличающихся экологических условиях размах вариации реализованных отрезков в пределах нормы реакции может быть разным. Как правило, у растений увеличение размаха вариации со смещением в направлении увеличения изменчивости признака наблюдаются, во-первых, при неблагоприятных условиях и могут трактоваться как динамические проявления поиска жизнеспособной морфологической структуры организма (с последующим закреплением адаптивных форм с уменьшением уровня варьирования) или, во-вторых, как проявление разрушения целостности морфологической структуры в условиях крайнего стресса. Второе сопровождается снижением показателей жизнеспособности организма – размеров, биомассы, способностей к воспроизводству.

Уровни общей изменчивости (коэффициент вариации (CV), %) признаков морфологической структуры надземных побегов картофеля сорта 'Башкирский' колеблются в широких пределах - от очень высокого до низкого. Очень высокий уровень изменчивости по вариантам опыта имеет признак длина черешка (40–48%); высокий – число побегов (28–29%); от среднего до высокого – индекс листа (13–24%); средний – ширина листа (14–18%), ширина доли листа (13–19%), длина доли листа (13–20%); от низкого до среднего – число пар долей (8–14%); низкий – индекс доли (12%), число листьев (8–11%), длина листа (10–12%), высота побега (10–12%). Признаки с очень низким уровнем изменчивости (менее 7%) не отмечены. В этом ряду можно предполагать снижение роли признака в адаптивном морфогенезе, однако это справедливо только в случаях одновременного снижения согласованной изменчивости (усредненного коэффициента детерминации признака с прочими признаками морфологической структуры – $R^2_{сб}$) с переходом признака в ряд генотипических индикаторов. Индикационную роль признака в сложении морфологической структуры растения и изменение этой роли в условиях адаптации к стрессу можно оценить, анализируя структуру морфологической изменчивости организма, которая представляет координацию соотношений общей и согласованной изменчивости всех признаков морфологической структуры [Ростова, 2002].

На рисунке 1 представлена структура морфологической изменчивости надземных вегетативных органов картофеля. К генотипическим (таксономическим) индикаторам относятся признаки с низкими показателями общей и согласованной изменчивости: высота растения, число листьев, длина листа, число пар долей листа, индекс доли листа, индекс листа. Эти слабо взаимосвязанные в развитии признаки в наибольшей степени детерминируются генотипом и не играют большой роли в адаптации растений к неблагоприятным условиям. Низкий уровень общей изменчивости при высокой согласованной изменчивости характерен для биологических индикаторов, определяющих образ растения: длины и ширины доли листа и ширины листа. Эти признаки также не играют значительной роли в адаптивном морфогенезе растений. Высокую общую и низкую согласованную изменчивость имеют экологические индикаторы, в наибольшей степени среди всех признаков зависящие от внешних условий (длина черешка и число побегов). В большей степени такая индикаторная роль присуща признаку число побегов. Более широкий разброс показателей согласованной изменчивости отмечен для длины черешка с тенденцией перехода признака в ранг эколого-биологических (системных) индикаторов – с высокими показателями общей и согласованной изменчивости – в варианте 75×75 см. Причем, при наибольшей плотности посадки средняя длина черешка уменьшается в 1.5 раза и в 8.2 раза уменьшается показатель согласованной изменчивости, т.е. при увеличении плотности посадки отмечается автономизация в развитии признака. Для числа побегов с уменьшением площади питания и увеличением конкуренции за свет отмечается обратная тенденция – усиление роли признака как эколого-биологического индикатора, определяющего общее состояние системы. Среднее число побегов можно считать показателем благоприятности условий роста и развития растений картофеля сорта 'Башкирский' – с уменьшением корневой конкуренции за минеральное пита-

ние и улучшением светового режима происходит увеличение среднего числа побегов на растение в 1,4 раза (2.4 – 2.9 – 3.3).

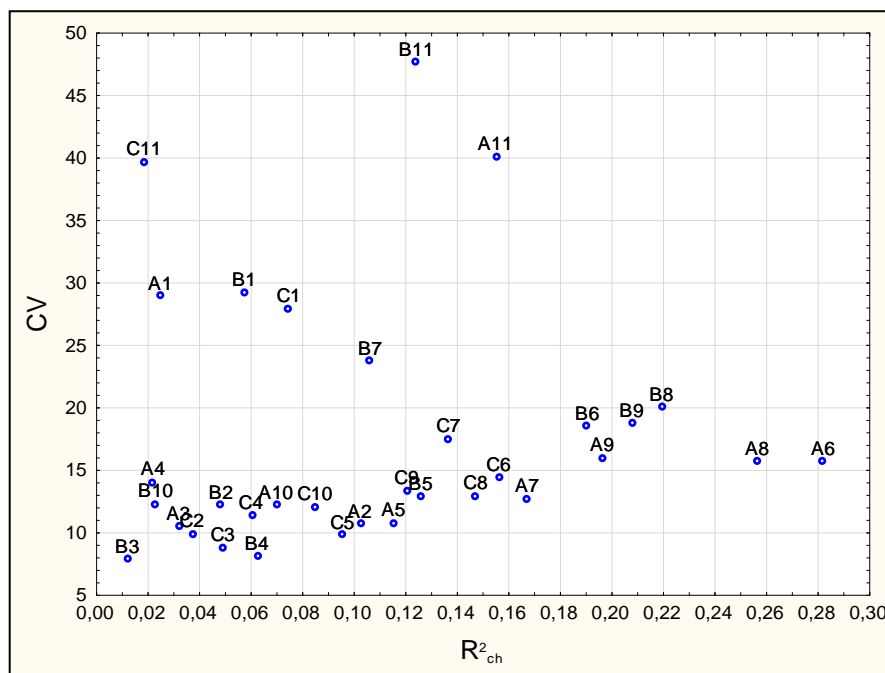


Рис. 1. Структура морфологической изменчивости растений картофеля сорта 'Башкирский' при разной плотности посадки

По оси ординат – общая изменчивость признака (коэффициент вариации (CV, %)), по оси абсцисс – согласованная изменчивость признака (усредненный коэффициент детерминации, R^2_{ch}); А – 75×75 см, В – 75×50 см, С – 75×25 см; признаки: 1 – число побегов, 2 – высота растения, 3 – число листьев на побеге, 4 – число пар долей листа, 5 – длина листа, 6 – ширина листа, 7 – индекс листа, 8 – длина доли листа, 9 – ширина доли листа, 10 – индекс доли листа, 11 – длина черешка

[The structure of morphological variability of the 'Bashkir' variety potato plants at different planting densities

On the ordinate axis – the total variability of the trait (coefficient of variation (CV, %), on the abscissa axis – the consistent variability of the trait (average coefficient of determination, R^2_{ch}); А – 75×75 cm, В – 75×50 cm, С – 75×25 cm; signs: 1 – the number of shoots, 2 – plant height, 3 – the number of leaves on the shoot, 4 – the number of pairs of leaf lobes, 5 – leaf length, 6 – leaf width, 7 – leaf index, 8 – leaf lobe length, 9 – leaf lobe width, 10 – leaf lobe index, 11 – petiole length]

Ранжирование признаков по силе влияния изучаемого фактора (доля факториальной дисперсии в общей дисперсии, η^2) проводили по результатам однофакторного дисперсионного анализа. По показателю силы влияния густоты посадки на признаки морфологической структуры надземной части растения они составили следующий ряд: высота растения (31%) – длина черешка (20%) – число пар долей листа (17%) – число побегов (16%) – число листьев на побеге (14%) – ширина листа (11%) – длина листа (11%) – длина доли листа (7%). По результатам дисперсионного анализа влияние изучаемого фактора на ширину доли листа, индекс листа и индекс доли листа статистически не значимо.

Результаты попарного сравнения и статистической значимости различий признаков по вариантам приведены в таблице.

Характеризующие форму (вытянутость) листа и его структурных единиц (доли листа) расчетные показатели – индексы – значимо не различаются в вариантах с разной плотностью посадки. Все мерные и счетные признаки морфологической структуры имеют статистически значимые различия по вариантам опыта. Причем число побегов и высота растения значимо отличаются по всем парам вариантов, тогда как определяющие площадь листа признаки, такие как длина и ширина листа, число пар долей листа, длина и ширина доли листа не имеют статистически значимых различий между вариантами 75×75 см и 75×25 см. Число листьев и длина черешка не имеют статистически значимых различий между вариантами 75×50 см и 75×25 см, при этом число листьев в разреженных посадках меньше, а длина черешка больше, чем в загущенных вариантах опыта. Возможно, что эти признаки могут быть определяющими в сложении листовой мозаики и оптимизации использования света растениями.

Средние значения и изменчивость признаков и достоверность их различия по вариантам опыта
[Average values and variability of traits and the reliability of their differences according to experimental variants]

Варианты и пары вариантов опыта	Признаки морфологической структуры										
	число побегов	высота растения	число листьев на побеге	число пар долей листа	длина листа	ширина листа	индекс листа	длина доли листа	ширина доли листа	индекс доли листа	длина черешка
Средние значения признака											
75	3.3	42.8	11.6	4.3	23.0	16.3	1.4	7.4	4.2	1.8	1.2
50	2.9	38.4	12.5	4.0	21.7	14.5	1.6	6.7	3.9	1.8	0.8
25	2.4	45.7	12.6	4.5	23.9	16.4	1.5	7.4	4.2	1.8	0.8
Достоверность различия пар выборок по средним значениям признака											
75 и 50	*	***	***	***	*	***	-	**	*	-	***
75 и 25	***	**	***	-	-	-	-	-	-	-	***
50 и 25	**	***	-	***	***	***	-	**	**	-	-
Изменчивость признака. CV											
75	28.9	10.6	10.5	14.0	10.8	15.7	12.6	15.6	15.9	12.1	40.0
50	29.1	12.1	7.8	8.1	12.8	18.5	23.6	20.0	18.7	12.2	47.6
25	27.9	9.8	8.7	11.3	9.7	14.4	17.5	12.9	13.3	12.1	39.6
Достоверность различия пар выборок по изменчивости признака											
75 и 50	-	-	-	***	-	-	***	-	-	-	-
75 и 25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50 и 25	-	-	-	*	-	-	-	**	*	-	-

Примечание. Различия статистически значимы для $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) и $P < 0.001$ (***).

Адаптивность различий размерных и счетных признаков растения на экологическом градиенте может быть оценена только при параллельном исследовании различий в изменчивости этих признаков. Так, например, при достоверном различии числа побегов и высоты растений между всеми вариантами опыта эти признаки не различаются значимо по изменчивости признака. Вероятно, что изменения этих признаков являются проявлениями, направленными на полноту использования ресурсов и не связаны с адаптивными механизмами морфогенеза, поскольку стабилизация любого признака является отражением результата, свершившейся (и на генетическом уровне контролируемой) адаптации с поддержанием уровня энтропии системы.

Рассмотрим для примера такой признак морфологической структуры листа, как число пар долей листа. При увеличении плотности посадки среднее число пар долей листа достоверно уменьшается с 4.3 до 4.0 шт. со статистически значимым уменьшением изменчивости признака. В этом проявляется адаптационное значение признака при умеренном загущении посадок. Дальнейшее загущение с увеличением конкуренции за свет и минеральное питание приводит к изменению роли признака морфологической структуры листа в поисках путей морфогенетической адаптации: происходит увеличение среднего значения признака (до 4.5 шт.) со статистически значимым увеличением изменчивости (дестабилизацией) признака (CV достоверно возрастает от 8.1 до 11.3%). Перераспределение усилий идет на увеличение размеров доли листа (средние размеры длины и ширины доли листа увеличиваются с 6.7 и 3.9 см до 7.4 и 4.2 см соответственно) и их стабилизацию (минимальные значения CV признаков в вариантах опыта – 12.9 и 13.3% соответственно). Таким образом, при возрастании конкуренции за свет и минеральное питание основная роль в адаптации переходит от признака число долей листа к размерам долей листа.

Для оценки характера изменения вариабельности признака по направлению усиления стресса (онтогенетические тактики) рассчитывали индекс виталитета растений (IVC) в вариантах опыта. Наибольшее значение виталитета растений – 1.06 – отмечено в варианте 75×75 см, в вариантах 75×50 см и 75×25 см, соответственно, 0.94 и 1.00. Таким образом, наименьший виталитет растений выявлен в варианте со средней нормой посадки. Более высокий виталитет растений в загущенной посадке складывается из-за более высоких, чем в варианте 75×50 см, средних значений параметров практически всех морфологических признаков кроме числа побегов.

Онтогенетические тактики формирования признаков морфологической структуры устанавливали по характеру изменчивости признака на градиенте благоприятствования условиям роста, устанавливаемом по значениям IVC. Как явно выраженные онтогенетические тактики рассматривали статистически значимые изменения уровня изменчивости признака в вариантах опыта. Таковыми проявили себя следующие признаки: число пар боковых долей листа, длина и ширина боковой доли листа. В изменениях числа пар боковых долей листа проявляется конвергентная онтогенетическая тактика (рис. 2). Это выражается в стабилизации признака с уменьшением его средних значений в направлении усиления стресса, приводящего к снижению продукционных процессов.

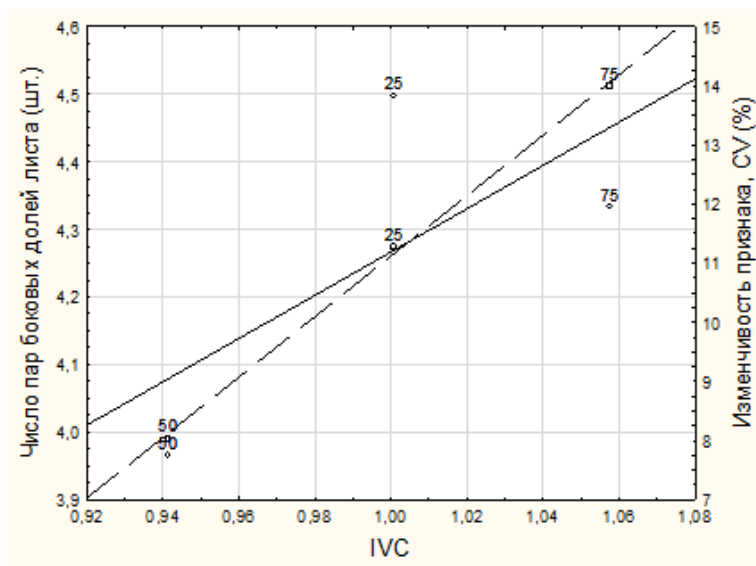


Рис. 2. Тренды конвергентной онтогенетической тактики признака число пар боковых долей листа картофеля сорта 'Башкирский'.

Левая ось и сплошная линия – средние значения признака, правая ось и пунктирная линия – изменчивость признака

[Trends in the convergent ontogenetic tactics of the trait "number of pairs of lateral leaf lobes" of the 'Bashkir' potato variety.

Left axis and solid line are the average values of the trait; right axis and dotted line are the variability of the trait]

Дивергентную онтогенетическую тактику проявили параметры (длина, ширина) наиболее крупной центральной доли пластинки листа. На рис. 3 представлен характер изменения длины доли листа и изменчивости признака.

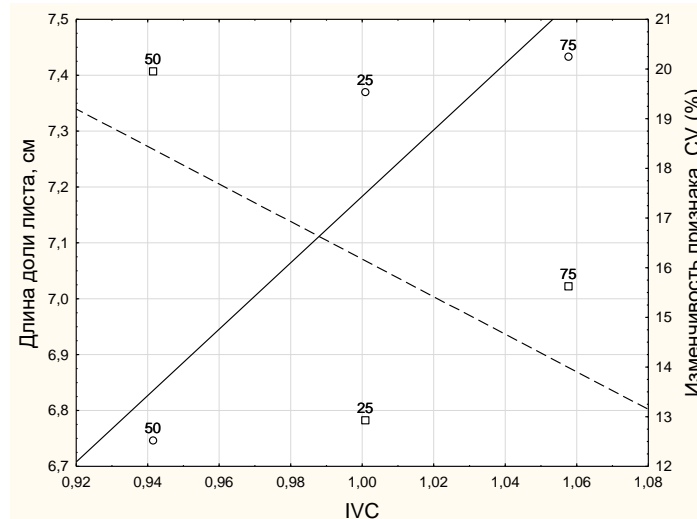


Рис. 3 Тренды конвергентной онтогенетической тактики признака длина доли листовой пластинки картофеля сорта 'Башкирский'.

Левая ось и сплошная линия – средние значения признака, правая ось и пунктирная линия – изменчивость признака

[Trends in divergent ontogenetic tactics of the trait "length of the leaf blade lobe" of the potato variety 'Bashkir'.

Left axis and solid line are the average values of the trait; right axis and dotted line are the variability of the trait]

Заключение

Анализ закономерностей изменчивости признаков морфологической структуры картофеля сорта 'Башкирский' на определяемом плотностью посадки экологическом градиенте показал их различную роль в адапционном морфогенезе растений. Наиболее выраженные адаптивные морфогенетические реакции показали признаки, определяющие площадь фотосинтезирующей поверхности: число пар боковых долей листовой пластинки, длина наиболее развитой боковой доли листовой пластинки и ширина боковой доли листовой пластинки. Для этих признаков установлены значимые различия по вариантам опыта как их средних значений, так и их изменчивости.

Список источников

1. Васильев А.А. Результаты многофакторных исследований по картофелю в условиях лесостепной зоны Южного Урала // Достижения науки и техники АПК. 2012. № 12. С. 32–35.
2. Васильев А.А., Бобоев Д.А. Результаты многофакторных исследований по агротехнике картофеля // Селекция, семеноводство и технология плодово-ягодных культур и картофеля: сб. науч. тр. Челябинск: Челябинский дом печати, 2012. Т. 14. С. 246–267.
3. Владимирова В.П., Гайнутдинов М.Т., Аппаков В.И. Агротехнические приемы повышения продуктивности картофеля на серой лесной почве лесостепи Среднего Поволжья // Вестник Казанского государственного аграрного университета. 2012. Т. 7, № 1. С. 119–124.
4. Дыйканова М.Е. Декапитация в технологии возделывания раннего картофеля // Картофелеводство: материалы науч.-практ. конф. «Современные технологии производства, хранения и переработки картофеля». М., 2017. С. 161–164.
5. Злобин Ю.А. Принципы и методы изучения ценологических популяций растений: учеб.-метод. пособие. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1989. 145 с.
6. Иванова Н.В. Эффективность агротехнических приемов повышения урожайности и качества раннего картофеля в лесостепи Новосибирского Приобья // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). 2011. № 1. С. 36–41.
7. Ишбирдин А.Р., Ишмуратова М.М. Адаптивный морфогенез и эколого-ценотические стратегии выживания травянистых растений // Методы популяционной биологии: сб. материалов VII Всерос. популяционного семинара. Сыктывкар, 2004. С. 113–120.
8. Ишбирдин А.Р., Кливаденко Е.В., Ишмуратова М.М. Адаптивный морфогенез *Solanum tuberosum* // Известия Самарского научного центра РАН. 2011. Т. 13, № 5–2. С. 76–78.
9. Каримова Л.Г., Аташ Пур Д. Популяционно-экологические реакции картофеля на условия выращивания // Актуальные вопросы современной науки: теория, технология, методология и практика: материалы XV междунар. науч.-практ. конф. Уфа, 2024. С. 20–24.
10. Мамаев С.А. Закономерности внутривидовой изменчивости семейства Pinaceae на Урале: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Свердловск, 1970. 54 с.
11. Методика изучения популяций редких и ресурсных видов растений на охраняемых природных территориях Республики Башкортостан / под ред. М.М. Ишмуратовой. Уфа: Башкирская энциклопедия, 2020. 275 с.
12. Митрофанов Ю.И. и др. Влияние обработок картофеля от фитофторы на урожайность и экономическую эффективность его возделывания // Инновационные агро- и биотехнологии в адаптивно-ландшафтном земледелии на мелиоративных землях: материалы междунар. науч.-практ. конф. Тверь, 2016. С. 32–36.
13. Ростова Н.С. Корреляции: структура и изменчивость. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2002. 308 с.
14. Табаков А.Г., Самаркина М.А., Шашкаров Л.Г. Урожайность картофеля в зависимости от агротехнических приемов возделывания // Вестник Казанского государственного аграрного университета. 2013. Т. 8, № 4. С. 143–145.

References

1. Vasil'ev A.A. [The results of multifactorial studies on potatoes in the conditions of the forest-steppe zone of the Southern Urals]. *Dostizheniya nauki i tehniki APK*. No. 12 (2012): pp. 32–35. (In Russ.).
2. Vasil'ev A.A., Boboev D.A. [The results of multifactorial research on potato agrotechnics]. *Selekcija? semenovodstvo i tehnologija plodovo-jaagodnykh kul'tur i kartofelja* [Breeding, seed production and technology of fruit and berry crops and potatoes: collection of scientific works]. Cheljabinsk, Cheljabinskij dom pečati, 2012, V. XIV, pp. 246–267. (In Russ.).
3. Vladimirov V.P., Gajnutdinov M.T., Appakov V.I. [Agrotechnical techniques for increasing potato productivity on gray forest soil of the forest steppe of the Middle Volga region]. *Vestnik Kazanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. V. 7, No. 1 (2012): pp. 119–124. (In Russ.).

4. Dyjkanova M.E. [Decapitation in early potato cultivation technology]. *Kartofelevodstvo* [Potato growing: materials of the scientific and practical conference "Modern technologies of potato production, storage and processing"]. Moscow, 2017, pp. 161-164. (In Russ.).
5. Zlobin Yu.A. *Principy i metody izučeniya cenotičeskikh populjacij rastenij* [Principles and methods of studying cenotic plant populations: an educational and methodological guide]. Kazan', Kazan. un-t Publ., 1989. 145 p. (In Russ.).
6. Ivanova N.V. [The effectiveness of agrotechnical techniques for increasing the yield and quality of early potatoes in the forest-steppe of the Novosibirsk region]. *Vestnik NGAU* (Novosibirskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet). No. 1 (2011): pp. 36-41. (In Russ.).
7. Ishbirdin A.R., Ishmuratova M.M. [Adaptive morphogenesis and ecological-cenotic strategies for the survival of herbaceous plants]. *Metody populjacionnoj biologii* [Methods of population biology: collection of materials of the VII All-Russian Population Seminar]. Syktyvkar, 2004, pp. 113-120. (In Russ.).
8. Ishbirdin A.R., Klivadenko E.V., Ishmuratova M.M. [Adaptive morphogenesis *Solanum tuberosum*]. *Izvestija Samarskogo naučnogo centra RAN*. V. 13, No. 5-2 (2011): pp. 76-78. (In Russ.).
9. Karimova L.G., Atash Pur D. [Population-ecological reactions of potatoes to growing conditions]. *Aktual'nye voprosy sovremennoj nauki: teorija, tehnologija, metodologija i praktika* [Topical issues of modern science: theory, technology, methodology and practice: proceedings of the XV International Scientific and Practical Conference]. Ufa, 2024, pp. 20-24. (In Russ.).
10. Mamaev S.A. *Zakonomenosti vnutrividovoj izmenčivosti semejstva Pinaceae na Urale. Avtoref. diss. dokt. biol. nauk* [Patterns of intraspecific variability of the Pinaceae family in the Urals. Abstract Dokt. Diss.]. Sverdlovsk, 1970. 54 p. (In Russ.).
11. Ishmuratova M.M., ed. *Metodika izučeniya populjacij redkich i resursnykh vidov rastenij na ochranjaemykh prirodnykh territorijach Respubliki Baškortostan* [Methodology for studying populations of rare and resource plant species in protected natural areas of the Republic of Bashkortostan]. Ufa, Bashkirskaja ènciklopedija Publ., 2020. 275 p. (In Russ.).
12. Mitrofanov Yu.I., Petrova L.I., Pugacheva L.V., Kaz'min A.E. [The effect of potato treatments from phytophthora on the yield and economic efficiency of its cultivation]. *Innovacionnye agro- i biotekhnologii v adaptivno-landšaftnom zemledelii na meliorativnykh zemljach* [Innovative agro- and biotechnologies in adaptive landscape farming on reclaimed lands: materials of the international scientific and practical conference]. Tver', 2016, pp. 32-36. (In Russ.).
13. Rostova N.S. *Korrelyacii: struktura i izmenčivost'* [Correlations: structure and variability. St-Peterburg, SPb. un-t Publ., 2002. 308 p. (In Russ.).
14. Tabakov A.G., Samarkina M.A., Shashkarov L.G. [Potato yield depending on agrotechnical methods of cultivation]. *Vestnik Kazanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. V. 8, No. 4 (2013): pp. 143-145. (In Russ.).

Статья поступила в редакцию 27.09.2024; одобрена после рецензирования 04.10.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 27.09.2024; approved after reviewing 04.10.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторах

А. Р. Ишбирдин – профессор, д-р биол. наук, профессор каф. биологии и экологии Института природы и человека;
Д. Аташ Пур – аспирант каф. биологии и экологии Института природы и человека;
И. С. Марданшин – д-р биол. наук, зав. лаб. семеноводства картофеля.

Information about the authors

A. R. Ishbirdin – Professor, Doctor of Biology, Professor of the Department of Biology and Ecology of the Institute of Nature and Man;
D. Atash Pur – graduate student of the Department of Biology and Ecology of the Institute of Nature and Man;
I. S. Mardanshin – Doctor of Biology, Head of the laboratory potato seed production.

Вклад авторов:

Ишбирдин А. Р. – концепция исследования, планирование эксперимента, написание исходного текста, итоговые выводы, статистическая обработка материала.
Аташ Пур Д. – планирование эксперимента, сбор материала, статистическая обработка материала.
Марданшин И. С. – концепция исследования, итоговые выводы.

Contribution of the authors:

Ishbirdin A. R. – research concept, experiment planning, writing the original text, final conclusions, statistical processing of the material.
Atash Pur D. – experiment planning, material collection, statistical processing of the material.
Mardanshin I. S. – research concept, final conclusions.

Научная статья

УДК 551.4 (476.13)

EDN EHSRDW

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-357-366



Динамика эффективности фиксации CO₂ штаммом *Bracteacoccus minor* при различной доступности азота

Анжелика Владимировна Кочубей¹, Ирина Андреевна Мальцева²,
Евгений Иванович Мальцев³, Александр Владимирович Яковийчук⁴✉

^{1, 2, 4} Мелитопольский государственный университет, Мелитополь, Россия

¹ KochubeyA92@yandex.ru

² maltseva-irina22@yandex.ru

³ Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия, maltsev.ye@yandex.ru

⁴✉ alex.yakov1991@yandex.ru

Аннотация. Чрезмерное выделение и накопление углекислого газа в атмосфере является серьезной проблемой, имеющей ряд негативных экологических последствий, включая глобальное потепление. Для борьбы с этими последствиями используются различные подходы, при этом основное внимание уделяется сокращению выбросов углекислого газа и достижению нулевого углеродного баланса. В дополнение к сокращению добычи и использованию ископаемых видов топлива в качестве потенциального решения рассматривается биосеквестрация. Микроводоросли особенно перспективны в этом отношении, поскольку они могут служить поглотителями углекислого газа при использовании в биотехнологических процессах. Некоторые штаммы микроводорослей, например, из рода *Bracteacoccus* Терег, были изучены на предмет их способности синтезировать ценные продукты, хотя способность поглощать углекислый газ данными объектами не изучалась, в частности при изменении концентрации доступного азота в питательной среде. В ходе исследования было установлено, что высокие уровни биодоступного азота увеличивают среднюю скорость поглощения углекислого газа, в то время как максимальное поглощение происходит, когда культура выходит из lag-фазы. Скорость фиксации углекислого газа и его количество, поглощенное *Bracteacoccus minor* (MZ-Ch31), напрямую зависят от продуктивности биомассы и концентрации хлорофилла.

Ключевые слова: биосеквестрация, биомасса, продуктивность, хлорофилл, среда культивирования, BBM, 3N BBM, F, F2

Для цитирования: Динамика эффективности фиксации CO₂ штаммом *Bracteacoccus minor* при различной доступности азота / А. В. Кочубей, И. А. Мальцева, Е. И. Мальцев, А. В. Яковийчук // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 357–366. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-357-366>.

Благодарности: публикация основана на исследованиях, выполненных в рамках темы «Секвестрационный потенциал микроводорослей и цианобактерий антропогенно-трансформированных экосистем Запорожской области в условиях возрастающей аридизации климата» (FRRS-2024-0003; № 124040100028-6).

BOTANY

Original article

Dynamics of CO₂ fixation efficiency by *Bracteacoccus minor* strain with different nitrogen availability

Angelika V. Kochubey¹, Irina A. Maltseva², Yevgenii I. Maltsev³,
Aleksandr V. Yakoviichuk⁴✉

^{1, 2, 4} Melitopol State University, Melitopol, Russia

¹ KochubeyA92@yandex.ru

² maltseva-irina22@yandex.ru

³ K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia, maltsev.ye@yandex.ru

⁴✉ alex.yakov1991@yandex.ru

Abstract. The excessive release and accumulation of carbon dioxide in the atmosphere is a major global issue with several negative environmental consequences, including global warming. Various approaches are used to eliminate these negative effects, with the main focus being on reducing carbon dioxide emissions and achieving a zero-carbon balance. In addition to decline fossil fuel mining and use, biosequestration is being considered as a potential solution. Microalgae are particularly promising in this regard, as they can serve as sinks for carbon dioxide when used in biotechnological processes. Some strains of microalgae from the genus *Bracteacoccus* Thereg, have been studied for their ability to synthesize valuable products. However, the ability to absorb carbon dioxide by these objects has not been studied, in particular, when the concentration of available nitrogen in the nutrient medium changes. The study found that high levels of bioavailable nitrogen increase the average rate of absorption of carbon dioxide, while maximum absorption occurs when the culture leaves the lag-phase. The rate of carbon dioxide fixation and its amount absorbed by *Bracteacoccus minor* (MZ-Ch31) directly depend on biomass productivity and chlorophyll concentration.

Keywords: bio-sequestration, biomass, productivity, chlorophyll, cultivation medium, BBM, 3N BBM, F, F2

For citation: Kochubey A. V., Maltseva I. A., Maltsev Ye. I., Yakoviichuk A. V. [Dynamics of CO₂ fixation efficiency by *Bracteacoccus minor* strain with different nitrogen availability]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2024): pp. 357-366. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-357-366>.

Acknowledgments: the publication is based on research carried out within the framework of the topic "Sequestration potential of microalgae and cyanobacteria of anthropogenic-transformed ecosystems of the Zaporozhye region in conditions of increasing climate aridization" (FRRS-2024-0003; № 124040100028-6).

Введение

Увеличение объемов использования ископаемой энергии на основе углерода, уничтожение лесов и другие изменения в землепользовании привели к еще большему количеству отходов в виде парниковых газов, а также к снижению способности планеты поглощать их [White, 2012]. Проблема эмиссии углекислого газа в атмосферу приобретает все более глобальные масштабы [Li et al., 2023], что связано в первую очередь с индустриализацией, увеличением численности населения и использованием ископаемой энергии [White, 2012]. Накопление парниковых газов имеет ряд негативных экологических последствий, одно из которых – глобальное потепление [Venkata Mohan et al., 2016; Zhu et al., 2016; Sangeetha et al., 2022], а также ряд сопутствующих проблем, что в комплексе стало серьезной угрозой для экологической устойчивости и безопасности человечества в целом [Ma et al., 2022]. В связи с этим все более актуальной становится стратегия нулевого углеродного баланса [Ma et al., 2022]. По вопросам изменения климата и снижения выбросов парниковых газов разработан ряд регламентирующих документов международного статуса, в которых Российская Федерация является стороной взаимодействия [Cherepovitsyna, Dorozhkina, Kostyleva, 2023].

Большие перспективы по снижению эмиссии углекислого газа может иметь биосеквестрация. Она предполагает возможность снижения эмиссии углекислого газа путем восстановления различного рода экосистем или введения в эксплуатацию не возделываемых территорий, акваторий и др. Однако данные мероприятия обычно продолжительны во времени, а для лесных экосистем требуют десятилетий. Ввиду данных ограничений микроводоросли выглядят как довольно перспективный объект биосеквестрации, а их использование в данном контексте становится все шире [Cheah et al., 2015; Zhu et al., 2016; Ma et al., 2022; Zhao et al., 2022; Li et al., 2023]. Известен положительный опыт применения некоторых штаммов микроводорослей для снижения выбросов CO₂ с дымовыми газами. Поглощение CO₂ клетками водорослей усиливается при синтезе вторичных метаболитов [Venkata Mohan et al., 2016]. Спектр синтезируемых микроводорослями метаболитов очень широк [Barkia, Saari, Manning, 2019; Dolganyuk et al., 2020; Coulombier, Jauffrais, Lebouvier, 2021; Ramos-Romero et al., 2021]. Объемы биомассы микроводорослей, выращиваемой для целей биотехнологических производств, постоянно растут.

Широко распространенной практикой активизации биосинтеза ценных метаболитов является культивирование в стрессовых условиях, в том числе выращивание в средах с ограниченной доступностью азота [Rios et al., 2015; Mudimu et al., 2017; Zhang et al., 2018; Janssen, Wijffels, Barbosa, 2019; Chen et al., 2022; Şirin, Serdar, 2024]. И хотя накопление вторичных метаболитов сопряжено с усилением поглощения CO₂, сами процессы биосеквестрации при ограничении азота исследованы мало [Farooq, 2022]. Однако они представляют значительный интерес с точки зрения достижения нулевого углеродного баланса.

В качестве биотехнологических объектов интенсивно исследуются представители рода *Bracteacoccus* Thereg, что связано с их способностью синтезировать при определенных условиях культивирования каротиноиды, липиды и ценные жирные кислоты [Ratha et al., 2013; Minyuk, Chelebieva, Chubchikova, 2014; Mamaeva et al., 2018; Maltsev et al., 2020; Chekanov et al., 2022; Lukavský et al., 2022; Malik et al., 2022]. В этом аспекте один из представителей – *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova исследован довольно слабо, хотя является космополитным видом и довольно широко распространен. Эффективность поглощения CO₂ данным видом пока не изучалась, хотя его широкое распространение в сочетании с биотехнологическим потенциалом может стать основой разработки проектов, объединяющих в себе решение проблем секвестрации углекислого газа и получения ценных метаболитов в промышленных масштабах.

Цель – изучить динамику биофиксации CO₂ штаммом *Bracteacoccus minor* (MZ-Ch31) в условиях различной доступности азотного питания.

Материалы и методы исследований

Выделенный из почвы штамм *Bracteacoccus minor* MZ-Ch31 (насаждение *Robinia pseudoacacia* L., парк им. Горького, г. Мелитополь, Россия), выращивали на стандартной среде BBM (Bischoff and Bold, 1963). Штамм в культуре поддерживается при $15 \pm 2^\circ\text{C}$ в пробирках, освещенных белыми диодами с интенсивностью света 120 Лк и режимом освещения 16:8 ч (свет/темнота) на среде BBM. Для эксперимента клетки инокулировали в 150 мл свежей среды BBM. При наступлении экспоненциальной фазы роста (через 5 дней) эту культуру использовали для постановки эксперимента. В качестве реакторов использовались плоскодонные колбы объемом 250 мл с герметичными крышками и системой обеспечения постоянства состава газовой смеси в колбе. Культуры аэрировали воздухом с помощью аквариумного компрессора Hailea ACO-308 (Hailea, China). Воздух подавали через стеклянную трубку с внутренним диаметром 4 мм со скоростью 0.1 л мин^{-1} . Для предотвращения бактериального загрязнения культуры использовали бактериальный вентиляционный фильтр (GSV, Italy) диаметром 40 мм, который устанавливался в разрыв между компрессором и стеклянной трубкой. Это позволило поддерживать культуру в альгологически чистом состоянии. Выращивание штамма проводили в стандартных условиях: интенсивность света – 5000 Лк; режим освещения – 16:8 ч (свет/ темнота); температура окружающей среды – $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Начальная концентрация – 2.89×10^5 клеток мл^{-1} .

Для постановки эксперимента использовали стандартную и модифицированную по содержанию азота среду BBM. Исследовали 4 варианта питательной среды, обозначенные как группа-1, группа-2, группа-3, группа-4. Группы отличались между собой содержанием в питательной среде общего азота (N) в форме нитратов (NO_3^-). Концентрации подбирались в соответствии с содержанием N в широко применяемых средах культивирования (3N BBM, BBM, F, F2). Соответственно концентрация азота в группах составляла: группа-1 – 0.124 г л^{-1} ; группа-2 – 0.04 г л^{-1} ; группа-3 – 0.025 г л^{-1} ; группа-4 – 0.012 г л^{-1} . Группа-2 выступала в качестве контрольной, т.к. имела стандартное для среды BBM содержание азота.

Плотность биомассы (B) определяли гравиметрически, путем выдерживания 1 мл биомассы в сушильном шкафу на протяжении 6 часов при 120°C и последующим взвешиванием сухого остатка.

Рост микроводорослей оценивали путем измерения сухого веса (CB). Измеренный сухой вес выражали в г л^{-1} . Объемная продуктивность биомассы (P) рассчитывалась по формуле в соответствии с источником [Morais, Costa, 2007]:

$$P (\text{г CB л}^{-1} \text{ день}^{-1}) = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1},$$

где X_1 – сухой вес (г CB л^{-1}) во время t_1 (день), и X_2 – сухой вес (г CB л^{-1}) во время t_2 (день).

Биофиксацию CO_2 (F) рассчитывали на продуктивность биомассы (P) по уравнению [Morais, Costa, 2007] с уточнениями:

$$F = P \frac{C_c}{100} \frac{M(\text{CO}_2)}{M(C)},$$

где P – продуктивность биомассы ($\text{г CB л}^{-1} \text{ день}^{-1}$), C_c – содержание C в биомассе (%), M (CO_2), (MC) – молярная масса CO_2 и C соответственно.

Содержание углерода в биомассе *Bracteacoccus minor* принимали равным 48.5%, что соответствует среднему значению для различных зеленых микроводорослей [Harwati, Willke, Vorlop, 2018].

Содержания хлорофиллов -a, -b (Chl a, b) определяли по методу [Yang et al., 1998]. Экстракцию пигментов из микроводорослей проводили 80.0% ацетоном. Для этого 10 мг отделенных от среды центрифугированием (10 мин. при 3000 об/мин^{-1} , 530 g) клеток подвергали 3-кратному замораживанию-размораживанию с целью разрушения клеточных оболочек. После чего добавляли 4 мл ацетона с целью создания соотношения биоматериал-экстрагент 1:40 (масса: объем) и дополнительно гомогенизировали биомассу путем растирания с кварцевым песком. Полученную смесь герметично закрывали и оставляли на 24 часа при температуре 25°C в темном месте для полной экстракции пигментов. Далее ацетоновый экстракт отделяли от осадка центрифугированием при $10000 \text{ об/мин}^{-1}$ (6000 g) и температуре 4°C на протяжении 10 мин. Анализировали интенсивность поглощения экстракта пигментов на спектрофотометре Ulab 102 (China) при длинах волн: 663.6; 646.6 нм, что соответствует максимуму поглощения для Chl a и Chl b. Расчеты проводили по следующей формуле:

$$\text{Chl a} + \text{b} = 17.76A_{646.6} + 7.34A_{663.6} (\mu\text{г мл}^{-1}).$$

Содержание суммы хлорофиллов выражали в мг г^{-1} СВ путем преобразования расчетных единиц $\mu\text{г мл}^{-1}$ с учетом коэффициента разведения и навески сухой биомассы.

Все измерения проводились минимум в трех повторностях, на графиках и в таблицах приведены средние величины и ошибки средней которые высчитывали по ANOVA с применением встроенных функций программы Microsoft Excel (v. 1903). Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$. Корреляционный анализ проводили с применением встроенной функции попарных корреляций Пирсона в программном обеспечении IBM SPSS Statistics v. 27. Достоверными считали корреляции при уровне значимости $p \leq 0.10$.

Результаты

В ходе эксперимента плотность биомассы *Bracteacoccus minor* (MZ-Ch31) в контрольной группе (группа-2) на 15 сутки культивирования достигла 0.77 г СВ л^{-1} , максимальный прирост биомассы наблюдался между 4–5 и 5–8 сутками (0.11 и 0.14 г СВ л^{-1}) (рис. 16). Более низкое содержание доступного азота в питательной среде (3 и 4 группа) сопровождалось уменьшением накопления биомассы штаммом и удлинением lag-фазы (рис. 1в, 1г). Наиболее сильно снижалась концентрация биомассы при минимальной концентрации азота в среде культивирования (группа-4) и составляла – 0.57 г СВ л^{-1} , при этом lag-фаза была максимальной и длилась 8 суток (рис. 1г).

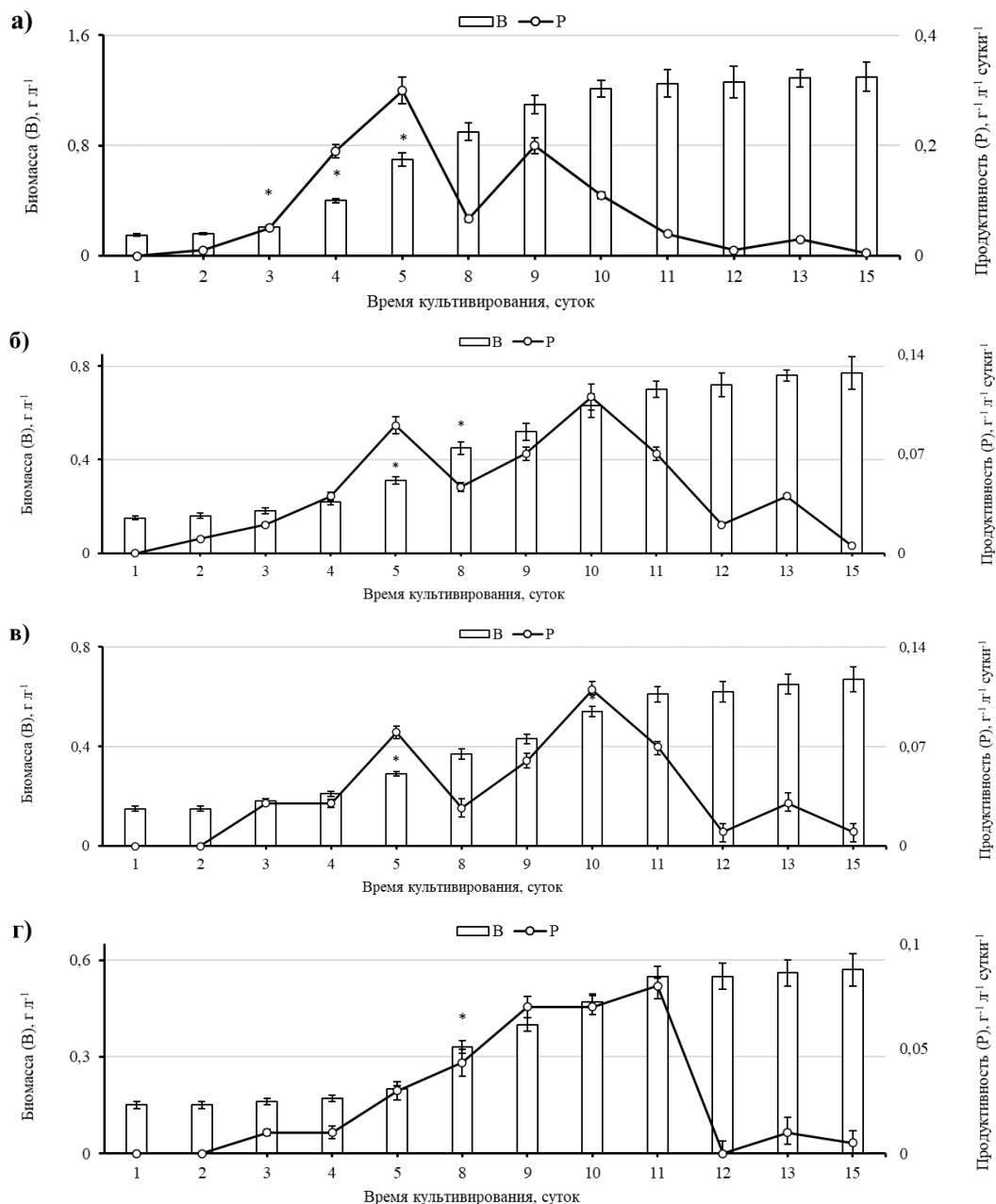


Рис. 1. Скорость роста (B), продуктивность (P) и биофиксация CO_2 (F) *Bracteacoccus minor* (MZ-Ch31) при культивировании в различных вариантах эксперимента:

а) – 0.124 ; б) – 0.04 ; в) – 0.025 ; г) – 0.012 г л^{-1} . * – разница достоверна относительно предыдущего значения на уровне $p \leq 0.05$

[Growth rate (B), productivity (P) and bio-fixation of CO_2 (F) *Bracteacoccus minor* (MZ-Ch31) during cultivation in various experimental variants:

а) – 0.124 ; б) – 0.04 ; в) – 0.025 ; г) – 0.012 g L^{-1} . Note: * – the difference is significant relative to the previous value at the $p \leq 0.05$ level]

В группе-4 между 11–12 сутками культивирования прирост биомассы не был отмечен, а максимальный достоверный прирост (0.13 г СВ л^{-1} ; $p \leq 0.05$) установлен между 5 и 8 сутками. Стоит отметить, что по мере снижения концентрации азота достоверные приросты биомассы смещаются на более поздние сроки.

Ограничение доступности азота в среде лимитирует рост и деление клеток, приводит к удлинению lag-фазы, сокращению логарифмической фазы и выходу на стационарную стадию роста культуры раньше относительно контроля. При повышении концентрации азота до 0.124 г л^{-1} (группа-1), что в 3.1 раза больше относительно стандартной BBM, отмечено наибольшее накопление биомассы среди всех исследованных экспериментальных групп. Максимальный прирост биомассы был между 4–5 сутками и составлял 0.30 г СВ л^{-1} ($p \leq 0.05$). Также в группе-1 установлена максимальная в эксперименте плотность биомассы 1.30 г СВ л^{-1} и самая короткая lag-фаза – 3 суток. Следует отметить, что плотность биомассы имела прямую зависимость от содержания азота в среде культивирования, что подтверждено коэффициентом корреляции ($r=1.0$; $p \leq 0.05$).

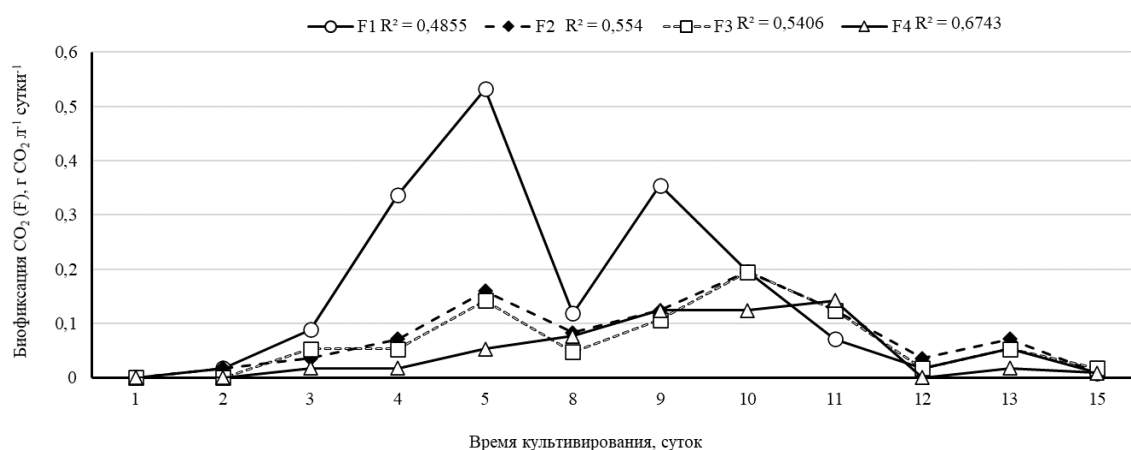


Рис. 2. Биофиксация CO₂ (F) *Bracteacoccus minor* (MZ-Ch31) при культивировании в различных вариантах эксперимента:

концентрация азота в среде: F1 – 0.124; F2 – 0.04; F3 – 0.025; F4 – 0.012 г л⁻¹. R² – величина достоверности аппроксимации (полиномиальная линия тренда)

[Bio-fixation of CO₂ (F) *Bracteacoccus minor* (MZ-Ch31) during cultivation in various experimental variants:

Nitrogen concentration in medium: F1 – 0.124; F2 – 0.04; F3 – 0.025; F4 – 0.012 g L⁻¹. Note: R² – approximation accuracy (polynomial trend line)]

Максимальная среди исследованных групп продуктивность биомассы установлена для группы-1 с наибольшим содержанием азота в питательной среде. Она достигала максимального значения ($0.3 \text{ г СВ л}^{-1} \text{ сутки}^{-1}$) на 5 день культивирования с дальнейшим снижением до минимума в конце эксперимента. В стандартной среде BBM (группа-2) максимум продуктивности составлял $0.11 \text{ г СВ л}^{-1} \text{ сутки}^{-1}$, так же, как и в группе-3. В эксперименте с минимальным количеством азота в среде (группа-4) максимум продуктивности приходился на 10 сутки – $0.08 \text{ г СВ л}^{-1} \text{ сутки}^{-1}$.

Стоит отметить, что при культивировании штамма в экспериментальных группах 1 – 3 наблюдался рост продуктивности с двумя пиками, в группе-1 – на 5 и 9 сутки, в группе-2 – на 5 и 10 сутки. Далее происходило резкое снижение продуктивности, связанное, очевидно, с нарастающим истощением питательных компонентов в среде и замедлением роста и деления клеток. В группе-4 пик продуктивности приходится на 11 сутки с дальнейшим резким снижением.

Ежедневные показатели биофиксации CO₂ в контрольной группе (группа-2) снижались по мере старения культуры (рис. 2). Максимальная эффективность поглощения CO₂ штаммом в стандартной среде BBM (группа-2) наблюдалась на 10 сутки и составляла $0.2 \text{ г CO}_2 \text{ л}^{-1} \text{ сутки}^{-1}$, а минимальная – на 2 и 15 сутки культивирования, что связано с низким приростом биомассы. В группе-1 максимум фиксации CO₂ составлял $0.53 \text{ г CO}_2 \text{ л}^{-1}$ на 5 сутки роста. Это самый высокий показатель в эксперименте (рис. 1a). В группе-4 максимальное поглощение было значительно ниже – всего $0.14 \text{ г CO}_2 \text{ л}^{-1} \text{ сутки}^{-1}$ и отмечено на 11 сутки культивирования.

Средняя скорость биофиксации углекислого газа за весь период культивирования снижалась с уменьшением концентрации азота в питательной среде ($r=1.0$; $p \leq 0.05$) (табл. 1). В группе-4 она была наименьшей. Также минимальным в этой группе было и общее количество утилизованного за 14 суток эксперимента CO₂. Относительно контрольной группы данные показатели были меньше в 1.6 раз. Повышение концентрации азота в питательной среде приводит к повышению как средней скорости биофиксации CO₂, так и общего количества поглощенного углекислого газа почти в 2 раза относительно стандартной среды BBM.

Таблица 1

Биомасса и биофиксация CO₂ *Bracteacoccus minor* MZ-Ch31 в различных вариантах эксперимента (M±SD; n = 3)

[Biomass and bio-fixation of CO₂ *Bracteacoccus minor* MZ-Ch31 in various experimental variants (M±SD; n = 3)]

Варианты эксперимента	Биомасса на 14 суток, г СВ л ⁻¹	Содержание хлорофиллов (a, b) на 14 суток, мг г ⁻¹ СВ	Средняя скорость биофиксации CO ₂ за 14 суток, г CO ₂ л ⁻¹ день ⁻¹	Утилизированный CO ₂ за 14 суток, г л ⁻¹	Содержание азота в среде, мг л ⁻¹
Группа-1	1.3±0.03 [#]	2.34±0.24 ^{*#}	0.16	1.8±0.17 [#]	0.124
Группа-2 (BBM)	0.77±0.17 [*]	1.72±0.18 [*]	0.08	0.93±0.06 [*]	0.040
Группа-3	0.67±0.07	1.13±0.12 ^{*#}	0.07	0.81±0.06	0.025
Группа-4	0.57±0.03 [#]	0.58±0.07 ^{*#}	0.05	0.58±0.05 ^{*#}	0.012

Примечание. * – разница достоверна относительно предыдущей группы на уровне p≤0.05; # – разница достоверна относительно группы-2 (BBM) на уровне p≤0.05.

Содержание хлорофиллов (a, b) определяли в конце эксперимента на 14 суток. Стоит отметить, что снижение концентрации азота в среде привело к уменьшению содержания хлорофиллов (r=1.000; p≤0.01). Результаты корреляционного анализа показали (табл. 2), что содержание хлорофиллов может быть одним из показателей секвестрационных характеристик штамма, так как для *Bracteacoccus minor* MZ-Ch31 установлена прямая (достоверная) корреляционная зависимость между концентрацией хлорофилла, параметрами биофиксации и утилизированного CO₂. Это обусловлено тем, что фотосинтез сопровождается поглощением углекислого газа и является основным метаболическим плюзом, обеспечивающим накопление прекурсоров для биосинтеза первичных и вторичных метаболитов, необходимых для роста и деления клеток.

Обсуждение

Скорость поглощения CO₂ для *Bracteacoccus minor* (MZ-Ch31) хорошо коррелирует с ростом биомассы, поскольку более высокое поглощение CO₂ в фотоавтотрофных условиях приводит к высокой продуктивности биомассы. Такая же зависимость установлена для *Chlorella* sp. и, как предполагают авторы, заметное увеличение продуктивности биомассы может быть объяснено усиленной фотосинтетической активностью и функцией ключевых фотоавтотрофных ферментов [Butti, Venkata Mohan, 2018]. Скорость биофиксации углекислого газа у *Bracteacoccus minor* MZ-Ch31 имела прямую зависимость от концентрации хлорофиллов в клетке (r = 0.918; p≤0.10). Азотное голодание в качестве инструмента повышения биофиксации CO₂ неэффективно, поскольку приводит к снижению общего количества биомассы, а также количества хлорофиллов.

Таблица 2

Результаты корреляционного анализа

[The results of the correlation analysis]

Показатели		B	Chl	F	CU	N
B	Корреляция Пирсона	1	0.918 [*]	0.999 ^{***}	0.999 ^{***}	1.000 ^{***}
	знач. (двухсторонняя)		0.082	0.001	0.001	<0.001
Chl	Корреляция Пирсона	0.918 [*]	1	0.918 [*]	0.923 [*]	0.908 [*]
	знач. (двухсторонняя)	0.082		0.082	0.077	0.092
F	Корреляция Пирсона	0.999 ^{***}	0.918 [*]	1	1.000 ^{***}	0.998 ^{**}
	знач. (двухсторонняя)	0.001	0.082		<0.001	0.002
CU	Корреляция Пирсона	0.999 ^{***}	0.923 [*]	1.000 ^{***}	1	0.997 ^{**}
	знач. (двухсторонняя)	0.001	0.077	0		0.003
N	Корреляция Пирсона	1.000 ^{***}	0.908 [*]	0.998 ^{**}	0.997 ^{**}	1
	знач. (двухсторонняя)	<0.001	0.092	0.002	0.003	

Примечания: B – биомасса *Bracteacoccus minor* MZ-Ch31 на 14 суток, г СВ л⁻¹; Chl – содержание хлорофиллов (a, b) на 14 суток, мг г⁻¹ СВ; F – средняя скорость биофиксации CO₂ за 14 суток, г CO₂ л⁻¹ день⁻¹; CU – утилизированный CO₂ за 14 суток, г л⁻¹; N – содержание азота в питательной среде, мг л⁻¹; n = 4. * – корреляция достоверна на уровне p≤0.10; ** – корреляция достоверна на уровне p≤0.05; *** – корреляция достоверна на уровне p≤0.01.

Максимальная описанная на данный момент способность поглощать углекислый газ установлена для *Chlorella vulgaris* – от 3.45 г CO₂ л⁻¹ день⁻¹ до 6.24 г CO₂ л⁻¹ день⁻¹, *Aphanothece microscopica* Nageli – 5.44

г CO₂ л⁻¹ день⁻¹ [Fan et al., 2008; Ho et al., 2011]. Также высокие значения отмечены для *Nannochloropsis gaditana* – 1.7 г CO₂ л⁻¹ день⁻¹ [Adamczyk, Lasek, Skawińska, 2016], *Synechocystis aquatilis* SI-2 – 1.5 г CO₂ л⁻¹ день⁻¹ [Murakami, Ikenouchi, 1997]. В среднем биофиксация CO₂ для представителей микроводорослей различных филогенетических и экологических групп варьирует от 0.02 до 6.24 г CO₂ л⁻¹ день⁻¹ [Ho et al., 2011]. Большая вариативность данных может быть следствием как индивидуальных особенностей видов водорослей, так и условий культивирования, включая исходную концентрацию биомассы водорослей. Для *Bracteacoccus minor* (MZ-Ch31) в условиях нашего эксперимента наибольшее поглощение углекислого газа было 0.53 г CO₂ л⁻¹ день⁻¹, среднее – 0.16 г CO₂ л⁻¹ день⁻¹. Дальнейшие исследования позволят получить более полные характеристики биофиксации CO₂ штаммом.

Заключение

Скорость биофиксации и общее количество поглощенного CO₂ *Bracteacoccus minor* (MZ-Ch31) зависит от концентрации азота в питательной среде. Повышение доступности азота увеличивает среднюю скорость поглощения углекислого газа с 0.05 г CO₂ л⁻¹ сутки⁻¹ до 0.16 г CO₂ л⁻¹ сутки⁻¹. Максимум поглощения углекислого газа соответствовал 0.53 г CO₂ л⁻¹ сутки⁻¹ и был достигнут в момент выхода культуры с lag-фазы. Скорость биофиксации и количество поглощенного углекислого газа *Bracteacoccus minor* (MZ-Ch31) прямо зависит от концентрации биомассы ($r = 0.999$ и $r = 0.999$; $p \leq 0.01$) и хлорофиллов ($r = 0.918$ и 0.923 ; $p \leq 0.10$).

Список источников

- Adamczyk M., Lasek J., Skawińska A. CO₂ biofixation and growth kinetics of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis gaditana* // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2016. Vol. 179, № 7. P. 1248–1261.
- Barkia I., Saari N., Manning S.R. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition // Marine drugs. 2019. Vol. 17, № 5. Art. 304.
- Butti S.K., Venkata Mohan S. Photosynthetic and lipogenic response under elevated CO₂ and H₂ conditions – high carbon uptake and fatty acids unsaturation // Frontiers in Energy Research. 2018. Vol. 6. Art. 27.
- Cheah W.Y. et al. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae // Bioresource technology. 2015. Vol. 184. P. 190–201.
- Chen X. et al. Nitrogen starvation enhances the production of saturated and unsaturated fatty acids in *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW8 by regulating key biosynthetic genes // Marine drugs. 2022. Vol. 20, № 10. Art. 621.
- Chekanov K. et al. Differential responses to UV-A stress recorded in carotenogenic microalgae *Haematococcus rubicundus*, *Bracteacoccus aggregatus*, and *Deasonia* sp. // Plants. 2022. Vol. 11, № 11. Art. 1431.
- Cherepovitsyna A.A., Dorozhkina I.P., Kostyleva V.N. Sequestration and use of carbon dioxide: the essence of technology and approaches to the classification of the projects // Russian Journal of Industrial Economics. 2023. Vol. 15, № 4. P. 473–487.
- Coulombier N., Jauffrais T., Lebouvier N. Antioxidant compounds from microalgae: a review // Marine drugs. 2021. Vol. 19, № 10. Art. 549.
- Dolganyuk V. et al. Microalgae: A promising source of valuable bioproducts // Biomolecules. 2020. Vol. 10, № 8. Art. 1153.
- Fan L.-H. et al. Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris* // Journal of Membrane Science. 2008. Vol. 325, № 1. P. 336–345.
- Farooq W. Maximizing energy content and CO₂ bio-fixation efficiency of an indigenous isolated microalga *Parachlorella kessleri* HY-6 through nutrient optimization and water recycling during cultivation // Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. Vol. 10, № 9. Art. 804608.
- Harwati T.U., Willke T., Vorlop K.D. Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae *Chlorococcum* sp. // Bioresource Technology. 2018. Vol. 121. P. 54–60.
- Ho S.-H. et al. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems – A review // Biotechnology Advances. 2011. Vol. 29, № 2. P. 189–198.
- Janssen J.H., Wijffels R.H., Barbosa M.J. Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* during nitrogen starvation // Biology. 2019. Vol. 8, № 1. Art. 5.
- Li S. et al. Production of sustainable biofuels from microalgae with CO₂ bio-sequestration and life cycle assessment // Environmental research. 2023. Vol. 227. Art. 115730.
- Lukavský J. et al. The alga *Bracteacoccus bullatus* (Chlorophyceae) isolated from snow, as a source of oil comprising essential unsaturated fatty acids and carotenoids // Journal of Applied Phycology. 2022. In Review. preprint. DOI: 10.21203/rs.3.rs-2125780/v1.
- Ma Z. et al. Microalgae-based biotechnological sequestration of carbon dioxide for net zero emissions // Trends in biotechnology. 2022. Vol. 40, № 12. P. 1439–1453.

18. Malik S. et al. Characterization of a newly isolated self-flocculating microalga *Bracteacoccus pseudominor* BERC09 and its evaluation as a candidate for a multiproduct algal biorefinery // *Chemosphere*. 2022. Vol. 304. Art. 135346.
19. Maltsev Y.I. et al. Biotechnological potential of a new strain of *Bracteacoccus bullatus* (Sphaeropleales, Chlorophyta) as a promising producer of omega-6 polyunsaturated fatty acids // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2020. Vol. 67. P. 185–193.
20. Mamaeva A. et al. Simultaneous increase in cellular content and volumetric concentration of lipids in *Bracteacoccus bullatus* cultivated at reduced nitrogen and phosphorus concentrations // *Journal of Applied Phycology*. 2018. Vol. 30. P. 2237–2246.
21. Minyuk G.S., Chelebieva E.S., Chubchikova I.N. Secondary carotenogenesis of the green microalga *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova (Chlorophyta) in a two-stage culture // *International Journal on Algae*. 2014. Vol. 16, № 4. P. 354–368.
22. Morais M.G., Costa J.A.V. Carbon dioxide mitigation with *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors // *Biotechnol. Lett.* 2007. Vol. 29. P. 1349–1352.
23. Mudimu O. et al. Screening of microalgae and cyanobacteria strains for α -tocopherol content at different growth phases and the influence of nitrate reduction on α -tocopherol production // *Journal of Applied Phycology*. 2017. Vol. 29. P. 2867–2875.
24. Murakami M., Ikenouchi M. The biological CO₂ fixation and utilization project by rite (2) – screening and breeding of microalgae with high capability in fixing CO₂ – // *Energy Conversion and Management*. 1997. Vol. 38. P. 493–497.
25. Ramos-Romero S. et al. Edible microalgae and their bioactive compounds in the prevention and treatment of metabolic alterations // *Nutrients*. 2021. Vol. 13, № 2. Art. 563.
26. Ratha S.K. et al. Exploring nutritional modes of cultivation for enhancing lipid accumulation in microalgae: Exploring nutritional modes of cultivation // *Journal of Basic Microbiology*. 2013. Vol. 53, № 5. P. 440–450.
27. Rios L.F. et al. Nitrogen starvation for lipid accumulation in the microalga species *Desmodesmus* sp. // *Applied biochemistry and biotechnology*. 2015. Vol. 175, № 1. P. 469–476.
28. Sangeetha M. et al. Biosequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase from novel *Streptomyces kunmingensis* // *Archives of microbiology*. 2022. Vol. 204, № 5. Art. 270.
29. Şirin P.A., Serdar S. Effects of nitrogen starvation on growth and biochemical composition of some microalgae species // *Folia microbiologica*. 2024. Vol. 69, № 4. P. 889–902.
30. Venkata Mohan S. et al. A circular bioeconomy with biobased products from CO₂ sequestration // *Trends in biotechnology*. 2016. Vol. 34, № 6. P. 506–519.
31. White W.A. Biosequestration and ecological diversity. Boca Raton: CRC Press, 2012. 250 p.
32. Yang C.-M. et al. Methods for the determination of the chlorophylls and their derivatives // *Taiwania*. 1998. Vol. 43, № 2. P. 116–122.
33. Zhang W.W. et al. Enhancing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* by coupled light intensity and nitrogen starvation in column photobioreactors // *Journal of microbiology and biotechnology*. 2018. Vol. 28, № 12. P. 2019–2028.
34. Zhao Y. et al. Screening and application of *Chlorella* strains on biosequestration of the power plant exhaust gas evolutions of biomass growth and accumulation of toxic agents // *Environmental science and pollution research international*. 2022. Vol. 29, № 5. P. 6744–6754.
35. Zhu X. et al. An informatics-based analysis of developments to date and prospects for the application of microalgae in the biological sequestration of industrial flue gas // *Applied microbiology and biotechnology*. 2016. Vol. 100, № 5. P. 2073–2082.

References

1. Adamczyk M., Lasek J., Skawińska A. CO₂ biofixation and growth kinetics of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis gaditana*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V. 179, No. 7 (2016): pp. 1248–1261.
2. Barkia I., Saari N., Manning S.R. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine drugs*. V. 17, No. 5 (2019). Art. 304.
3. Butti S.K., Venkata Mohan S. Photosynthetic and lipogenic response under elevated CO₂ and H₂ conditions – high carbon uptake and fatty acids unsaturation. *Frontiers in Energy Research*. V. 6 (2018). Art. 27.
4. Cheah W.Y., Show P.L., Chang J.S., Ling T.C., Juan J.C. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. *Bioresour. Technol.* V. 184 (2015): pp. 190–201.
5. Chen X., He Y., Liu L., Zhu X., Sen B., Wang G. Nitrogen starvation enhances the production of saturated and unsaturated fatty acids in *Aurantiochytrium* sp. PKU#SW8 by regulating key biosynthetic genes. *Marine drugs*. V. 20, No. 10 (2022): Art. 621.

6. Chekanov K., Shibzukhova K., Lobakova E., Solovchenko A. Differential responses to UV-A stress recorded in carotenogenic microalgae *Haematococcus rubicundus*, *Bracteacoccus aggregatus*, and *Deasonia* sp. *Plants*. V. 11, No. 11 (2022). Art. 1431.
7. Cherepovitsyna A.A., Dorozhkina I.P., Kostyleva V.N. Sequestration and use of carbon dioxide: the essence of technology and approaches to the classification of the projects. *Russian Journal of Industrial Economics*. V. 15, No. 4 (2023): pp. 473-487.
8. Coulombier N., Jauffrais T., Lebouvier N. Antioxidant compounds from microalgae: a review. *Marine drugs*. V. 19, No. 10 (2021). Art. 549.
9. Dolganyuk V., Belova D., Babich O., Prosekov A., Ivanova S., Katserov D., Patyukov N., Sukhikh S. Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. *Biomolecules*. V. 10, No. 8 (2020). Art. 1153.
10. Fan L.-H., Zhang Y.-T., Zhang L., Chen H.-L. Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Membrane Science*. V. 325, No. 1 (2008): pp. 336-345.
11. Farooq W. Maximizing energy content and CO₂ bio-fixation efficiency of an indigenous isolated microalga *Parachlorella kessleri* HY-6 through nutrient optimization and water recycling during cultivation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 10, No. 9 (2022). Art. 804608.
12. Harwati T.U., Willke T., Vorlop K.D. Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae *Chlorococcum* sp. *Bioresource Technology*. V. 121 (2018): pp. 54-60.
13. Ho S.-H., Chen C.-Y., Lee D.-J., Chang J.-S. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems – A review. *Biotechnology Advances*. V. 29, No. 2 (2011): pp. 189-198.
14. Janssen J.H., Wijffels R.H., Barbosa M.J. Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* during nitrogen starvation. *Biology*. Vol. 8, No. 1 (2019). Art. 5.
15. Li S., Chang H., Zhang S., Ho S.H. Production of sustainable biofuels from microalgae with CO₂ bio-sequestration and life cycle assessment. *Environmental research*. V. 227 (2023). Art. 115730.
16. Lukavský J., Kopecký J., Kubáč D., Kviderová J., Procházková L., Řezanka T. The alga *Bracteacoccus bullatus* (Chlorophyceae) isolated from snow, as a source of oil comprising essential unsaturated fatty acids and carotenoids. *Journal of Applied Phycology*. (2022). In Review. preprint. DOI: 10.21203/rs.3.rs-2125780/v1.
17. Ma Z., Cheah W.Y., Ng I.S., Chang J.S., Zhao M., Show P.L. Microalgae-based biotechnological sequestration of carbon dioxide for net zero emissions. *Trends in biotechnology*. V. 40, No.12 (2022): pp. 1439-1453.
18. Malik S., Ashraf M.U.F., Shahid A., Javed M.R., Khan A.Z., Usman M., Manivannan A., Mehmood M.A., Ashraf G.A. Characterization of a newly isolated self-flocculating microalga *Bracteacoccus pseudominor* BERC09 and its evaluation as a candidate for a multiproduct algal biorefinery. *Chemosphere*. V. 304 (2022). Art. 135346.
19. Maltsev Y.I., Maltseva I.A., Maltseva S.Yu., Kulikovskiy M.S. Biotechnological potential of a new strain of *Bracteacoccus bullatus* (Sphaeropleales, Chlorophyta) as a promising producer of omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Russian Journal of Plant Physiology*. V. 67 (2020): pp. 185-193.
20. Mamaeva A., Namsaraev Z., Maltsev Y., Gusev E., Kulikovskiy M., Petrushkina M., Filimonova A., Sorokin B., Zotko N., Vinokurov V., Kopitsyn D., Petrova D., Novikov A., Kuzmin D. Simultaneous increase in cellular content and volumetric concentration of lipids in *Bracteacoccus bullatus* cultivated at reduced nitrogen and phosphorus concentrations. *Journal of Applied Phycology*. V. 30 (2018): pp. 2237-2246.
21. Minyuk G.S., Chelebueva E.S., Chubchikova I.N. Secondary carotenogenesis of the green microalga *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova (Chlorophyta) in a two-stage culture. *International Journal on Algae*. V. 16, No. 4 (2014): pp. 354-368.
22. Morais M.G., Costa J.A.V. Carbon dioxide mitigation with *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnol. Lett.* V. 29 (2007): pp. 1349-1352.
23. Mudimu O., Koopmann I.K., Rybalka N., Friedl T., Schulz R., Bilger W. Screening of microalgae and cyanobacteria strains for α -tocopherol content at different growth phases and the influence of nitrate reduction on α -tocopherol production. *Journal of Applied Phycology*. V. 29 (2017): pp. 2867-2875.
24. Murakami M., Ikenouchi M. The biological CO₂ fixation and utilization project by rite (2) – screening and breeding of microalgae with high capability in fixing CO₂ –. *Energy Conversion and Management*. V. 38 (1997): pp. 493-497.
25. Ramos-Romero S., Torrella J.R., Pagès T., Viscor G., Torres J.L. Edible microalgae and their bioactive compounds in the prevention and treatment of metabolic alterations. *Nutrients*. V. 13, No. 2 (2021). Art. 563.
26. Ratha S.K., Babu S., Renuka N., Prasanna R., Prasad R.B.N., Saxena A.K. Exploring nutritional modes of cultivation for enhancing lipid accumulation in microalgae: Exploring nutritional modes of cultivation. *Journal of Basic Microbiology*. Vol. 53, No. 5 (2013): pp. 440-450.
27. Rios L.F., Klein B.C., Luz L.F., Jr Maciel Filho R., Wolf Maciel M.R. Nitrogen starvation for lipid accumulation in the microalga species *Desmodesmus* sp. *Applied biochemistry and biotechnology*. V. 175, No.1 (2015): pp. 469-476.

28. Sangeetha M., Sivarajan A., Radhakrishnan M., Siddharthan N., Balagurunathan R. Biosequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase from novel *Streptomyces kunmingensis*. *Archives of microbiology*. V. 204, No. 5 (2022). Art. 270.
29. Şirin P.A., Serdar S. Effects of nitrogen starvation on growth and biochemical composition of some microalgae species. *Folia microbiologica*. V. 69, No. 4 (2024): pp. 889-902.
30. Venkata Mohan S., Modestra J.A., Amulya K., Butti S.K., Velvizhi G. A circular bioeconomy with biobased products from CO₂ sequestration. *Trends in biotechnology*. V. 34, No. 6 (2016): pp. 506-519.
31. White W.A. Biosequestration and ecological diversity. Boca Raton, CRC Press, 2012. 250 p.
32. Yang C.-M., Chang K.-W., Yin M.-H., Huang H.-M. Methods for the determination of the chlorophylls and their derivatives. *Taiwania*. V. 43, No. 2 (1998): pp. 116-122.
33. Zhang W.W., Zhou X.F., Zhang Y.L., Cheng P.F., Ma R., Cheng W.L., Chu H.Q. Enhancing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* by coupled light intensity and nitrogen starvation in column photobioreactors. *Journal of microbiology and biotechnology*. V. 28, No. 12 (2018): pp. 2019-2028.
34. Zhao Y., Li J., Ma X., Fang X., Zhu B., Pan K. Screening and application of *Chlorella* strains on biosequestration of the power plant exhaust gas evolutions of biomass growth and accumulation of toxic agents. *Environmental science and pollution research international*. V. 29, No. 5 (2022): pp. 6744-6754.
35. Zhu X., Rong J., Chen H., He C., Hu W., Wang Q. An informatics-based analysis of developments to date and prospects for the application of microalgae in the biological sequestration of industrial flue gas. *Applied microbiology and biotechnology*. V. 100, No. 5 (2016): pp. 2073-2082.

Статья поступила в редакцию 12.09.2024; одобрена после рецензирования 09.10.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 12.09.2024; approved after reviewing 09.10.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторах

А. В. Кочубей – аспирант, ассистент кафедры биологии и биологического образования;

И. А. Мальцева – доктор биологических наук, профессор, декан факультета естественных наук;

Е. И. Мальцев – доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной систематики водных растений;

А. В. Яковийчук – кандидат биологических наук, доцент кафедры химии и химического образования.

Information about the authors

A. V. Kochubey – postgraduate student, Assistant of Biology and Biological Education Department;

I. A. Maltseva – doctor of biology, professor, dean of natural science faculty;

Ye. I. Maltsev – doctor of biology, associate professor, senior researcher of molecular systematics of aquatic plants department;

A. V. Yakoviichuk – candidate of biology, associate professor of chemistry and chemical education department.

Вклад авторов:

Кочубей А. В. – проведение экспериментальных исследований по определению скорости роста штамма, статистическая обработка материала, оформление списка литературы.

Мальцева И. А. – научное руководство; развитие методологии; итоговые выводы.

Мальцев Е. И. – концепция исследования, доработка текста.

Яковийчук А.В. – проведение экспериментальных исследований по концентрации хлорофиллов, написание текста статьи.

Contribution of the authors:

A. V. Kochubey – conducting experimental studies to determine the growth rate of the strain, statistical processing of the material, registration of the list of references.

I. A. Maltseva – research supervision; development of methodology; final conclusions.

Ye. I. Maltsev – research concept, text revision.

A. V. Yakoviichuk – conducting experimental studies on the concentration of chlorophylls, writing the text of the article.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

БОТАНИКА

Научная статья

УДК 582.946:631.529(470.13-25)

EDN INSOWB

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-367-373



**Антропоэкологические особенности форзиций при интродукции
в Ботаническом саду Института биологии Коми НЦ УрО РАН**

Светлана Алексеевна Мифтахова

Институт биологии Коми научного центра УрО РАН, Сыктывкар, Россия, mifs@ib.komisc.ru

Аннотация. Описаны особенности антропоэкологии интродуцированных растений *Forsythia girdaldiana* и *F. ovata* в дендрарии Ботанического сада Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Данные виды являются ценными декоративными раннецветущими кустарниками, способными не только произрастать в суровых условиях, но и сохранять декоративность. Определены сроки и продолжительность их цветения. Проведен анализ строения цветков *F. girdaldiana* и *F. ovata*, установлены их морфометрические параметры при интродукции в условиях севера. Для данных видов характерна гетеростилия в форме дистилии. Выявлено, что в условиях дендрария растения форзиций представлены только одной формой цветка, *F. girdaldiana* – короткостолбчатой, а *F. ovata* – длинностолбчатой, в связи с чем не может произойти легитимного опыления. Как раннецветущим, им присуще стремительное цветение. Основным способом опыления является энтомофилия. Цветкам обоих видов форзиций характерен синдром миофильного опыления, проявляющийся в простом, широко раскрытом венчике, легкодоступном нектаре и отчетливо выступающим наружу репродуктивным органам. В результате опытов предполагаем, что как у *F. girdaldiana*, так и у *F. ovata* возможны либо межвидовая гибридизация, либо факультативный апомиксис, что требует дополнительных исследований.

Ключевые слова: антропоэкология, *Forsythia girdaldiana*, *Forsythia ovata*, Ботанический сад, среднетаежная подзона Республики Коми, раннецветущие кустарники

Для цитирования: Мифтахова С. А. Антропоэкологические особенности форзиций при интродукции в Ботаническом саду Института биологии Коми НЦ УрО РАН // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 367–373. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-367-373>.

Благодарности: работа проведена на экспериментальной базе УНУ «Научная коллекция живых растений Ботанического сада Института биологии Коми НЦ УрО РАН», регистрационный номер 507428. Исследования выполнены в рамках государственного задания по теме: «Репродуктивный потенциал ресурсных растений при интродукции на европейском Северо-Востоке» № 122040600020-7.

BOTANY

Original article

**Anthecological features of forsythias during introduction in the
Botanical Garden of the Institute of Biology, Komi Science Centre
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences**

Svetlana A. Miftakhova

Institute of Biology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the RAS, Syktывkar, Russia, mifs@ib.komisc.ru

Abstract. The article describes anthecological features of the introduced samples of *Forsythia girdaldiana* and *Forsythia ovata* in the arboretum of the Botanical Garden at the Institute of Biology Komi SC UB RAS. These species are valuable decorative early-flowering shrubs, which can not only grow in severe conditions but also preserve their decorative value. The present study determines the time and duration of their flowering, analyzes the structure of the flowers of *F. girdaldiana* and *F. ovata*, and establishes the morphometric parameters during introduction in the conditions of the north. These species are characterized by heterostyly in the form of distily. In the conditions of the arboretum, forsythia plants have only one flower form, *F. girdaldiana* has a short-columned and *F. ovata* has a long-columned flower form and therefore legitimate pollination cannot occur. As early-flowering species, they are characterized by rapid flowering. The main pollination method is entomophilia. The flowers of both forsythia species are characterized by a myophilic pollination syndrome manifested in a

simple, wide-open corolla, easily-accessible nectar, and clearly-protruding reproductive organs. As a result of the experiments, we assume that both *F. giraldiana* and *F. ovata* can possibly have either interspecific hybridization or optional apomixis, which requires additional research.

Keywords: anthecology, *Forsythia giraldiana*, *Forsythia ovata*, Botanical Garden, Middle taiga subzone of the Komi Republic, early flowering shrubs

For citation: Miftakhova S. A. [Anthecological features of forsythias during introduction in the Botanical Garden of the Institute of Biology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2024): pp. 367-373. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-367-373>.

Acknowledgments: the study was carried out on the experimental base of the UNU “Scientific Collection of Living Plants at the Botanical Garden of the Institute of Biology, Komi Science Center, Ural Division, Russian Academy of Sciences”, reg. No. 507428. The research was conducted within the framework of the state assignment on the topic “Reproductive potential of resource plants during introduction in the European North-East” No. 122040600020-7.

Введение

Неоспорима важность зеленых насаждений для качества городской жизни. Зеленые насаждения, в частности кустарники, оказывают положительное влияние на самочувствие жителей и являются неотъемлемым компонентом ландшафтной архитектуры и городского дизайна. Красивоцветущие кустарники обеспечивают максимальный декоративный эффект во время своего цветения. Скучный ассортимент декоративных древесных и кустарниковых растений на севере делает актуальным привлечение новых видов и образцов путем увеличения числа декоративных растений, используемых при озеленении городских территорий. Одними из немногих представителей рановесеннецветущих растений являются форзиции. Форзиция или форсайтия относится к роду *Forsythia* Vahl. семейства Oleaceae. Согласно современным данным, род *Forsythia* насчитывает 13 природных видов. Для него характерна большая прерывистость ареала: 12 видов в Восточной Азии (Китай, Корея, Япония) и один вид *Forsythia europaea* Degen et Bald. – третичный реликт флоры Юго-Восточной Европы (Балканский полуостров) [Гладкова, 1981; The Plant List]. Такая прерывистость естественного распространения указывает на древность этого рода. Данный род является наиболее примитивным в семействе Oleaceae. Все представители рода *Forsythia* – листопадные кустарники или небольшие деревья с заметными ярко-желтыми цветками, которые появляются очень рано, еще до появления листьев.

Представители рода *Forsythia* применяются как лекарственные и декоративные растения. Например, *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl используется в медицинских целях, являясь одним из основных лекарственных растений, широко применяемых в китайской, японской и корейской народной медицине, в связи с чем в этих странах занимаются изучением химической природы и биологической эффективностью данного вида. Соединения, присутствующие в *F. suspensa*, включают фенилэтановидные гликозиды, три-терпеноиды, лигнаны и флавоноиды. Многие фармакологические исследования подтвердили, что плоды форзиции свисающей обладают противовоспалительной, антиоксидантной, противовирусной, противомикробной, противодиабетической, антигиперлипидемической и противоопухолевой активностью, а также гепатопротекторным, нейропротекторным и сердечно-сосудистым эффектами, помогают при антиандрогенном облысении [Lingdi Liu et al., 2022; Sansei Nishibe et al., 2021]. Впервые в Россию растения форзиции были завезены на Черноморское побережье в Никитский ботанический сад в 1824 г. [Коркешко, 1971]. На территории России выращивают 7 видов данного рода [Карпун, 2010]. Распространены в культуре в основном на юге страны, также выращиваются в Москве и с 1938 г. – в Санкт-Петербурге [Куклина, 1995]. В Европе (Голландия) первый описанный вид *F. suspensa* появился в 1833 г. [Минчинова, 2000]. Все представители рода могут использоваться в декоративном садоводстве. Их характерной особенностью является то, что цветут они одними из первых до распускания листьев, когда у большинства растений еще не началась вегетация. Цветут яркими золотисто-желтыми цветками по всей длине голых безлистных ветвей.

Изучение биологических и экологических характеристик различных видов рода *Forsythia* обеспечивает их успешное использование в культуре, которым в основном занимаются на юге страны, в частности во Всероссийском научно-исследовательском институте цветоводства и субтропических культур г. Сочи [Карпун, 2010; Маляровская, 2020].

В коллекции дендрария Ботанического сада род представлен двумя видами – *Forsythia giraldiana* Lingelsh. – форзицией Джиральда и *F. ovata* Nakai – форзицией овальной. Ранее в коллекции был образец *Forsythia viridissima* Lindl. – форзиции зеленой, который отнесен к группе малоперспективных в связи с низкой зимостойкостью и впоследствии выпал [Скупченко и др., 2003].

Пристального внимания заслуживает изучение форзиций как декоративных растений и введение их в культуру в среднетаежную подзону Республики Коми. Интродукция новых видов в данный регион тре-

бует изучения их биологических особенностей, в частности особенностей цветения и опыления в новых условиях. Существует ряд факторов, которые ограничивают широкое использование форзиции, особенно в северных условиях. Основными из них являются низкие температуры и возврат холодов весной. В литературе мы не нашли сведений о биологии цветения и экологии опыления данного растения в условиях севера.

Материал и методы исследования

Объектами исследований послужили образцы *Forsythia girdaldiana* и *F. ovata*, полученные семенами в 2006 г. из Таллинского ботанического сада (Эстония). Наблюдения за растениями осуществляли с 2020 г. Изучение биологии цветения и строения цветков проводилось с 2021 по 2023 гг. При описании генеративной сферы руководствовались атласом по описательной морфологии [Федоров, Артюшенко, 1975]. Изучение цветения и опыления форзиций проводили согласно методикам А.Н. Пономарева [1960] и Е.И. Демьяновой [2011]. Для отдельного цветка отмечали кратность его раскрытия и продолжительность жизни. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы MS Excel. Объем выборки при изучении морфологических параметров составил 30 цветков.

Для установления периода восприимчивости рыльца к пыльце применяли методику И. Робинсона [Robinson, 1924]. Для этого выбирали рыльца на разных стадиях развития и цветения. Помещали в 1–2%-ный раствор KMnO_4 на 1–2 мин., после этого промывали проточной водой и просматривали под биноклем. Рыльца, восприимчивые к пыльце, окрашивались, невосприимчивые – не окрашивались.

Для установления типа опыления растений в 2022 и 2023 гг. проводили опыт по контролируемому опылению. Для установления возможности идиогамии осуществили следующие варианты опыта: для проверки автогамии проводили изоляцию цветка и нанесение собственной пыльцы на рыльце для преодоления геркогамии; для возможности гейтогамии проводили кастрацию, принудительное опыление пыльцой цветка с этого же растения и изоляцию, контролем служило свободное опыление. Для установления возможности межвидовой гибридизации или апомиксиса на рыльце цветка *F. girdaldiana* нанесли пыльцу *F. ovata*, на рыльце цветка *F. ovata* – пыльцу *F. girdaldiana* с последующей изоляцией. Изоляцию проводили на стадии готовых к распусканию бутонов. Каждый вариант опыта проводили в 10-кратной повторности.

Названия таксонов приведены по базам данных [The Plant List, The International Plant Names Index].

Исследование проходило в дендрарии Ботанического сада Института биологии Коми НЦ УрО РАН, который расположен в 8 км от г. Сыктывкара (61.6° с.ш., 50.8° в.д.) и относится к южным районам Республики Коми, к подзоне средней тайги. Климат умеренно-континентальный, зима сравнительно суровая, лето короткое и прохладное. Среднегодовая температура воздуха в Сыктывкаре +0.4°C. За вегетационный период (150 дней) при среднесуточной температуре воздуха выше +5°C сумма суточных температур достигает 1 800°C, за период активной вегетации (90–110 дней) со среднесуточными температурами +10°C и выше – 1 450°C. Среднегодовая сумма осадков – 500–600 мм, основная масса которых выпадает в теплый период [Атлас ..., 1997].

Результаты исследования и их обсуждение

Введение форзиций в культуру в среднетаежной подзоне Республики Коми будет способствовать эстетическому оформлению насаждений и улучшению санитарно-гигиенических условий, позволит увеличить ассортимент видов декоративных растений, используемых для озеленения городских территорий. Цветение *F. girdaldiana* и *F. ovata* происходит в одно и то же время приблизительно в десятых числах мая (независимо от метеословий года), до распускания листьев. Низкие температуры во время цветения растения переносит хорошо. Цветение происходит быстро (стремительно), что характерно для всех весеннецветущих растений. После завершения этого периода сразу начинается рост побегов.

Изучение морфологии цветка имеет большое значение для выяснения системы опыления. Согласно литературным источникам, для видов рода *Forsythia* характерна гетеростилия [Гладкова, 1981]. Цветки актиноморфные, колокольчатые, желтые.

Цветок *F. girdaldiana*

Цветок обоеполюй, полный, симметричный, циклический. Цветоножка очень короткая, боковая, голая и гладкая. Покровы цветка представлены чашечкой и венчиком. Чашечка зеленая, четырехрассеченная, по краю мелкопильчатая, прижата к венчику, подпестичная. Четыре чашелистика сростаются своим основанием. Чашелистики волосистые. Венчик гладкий, голый, желтый, колокольчатого типа. Лепестки на 1/3 сростшиеся. Воронковидная трубка венчика короткая и широкая. Отгиб свободный, отклоненный, длиннее трубчатого основания венчика. После цветения венчик опадает. Андроей представлен двумя свободными тычинками, каждая из которых состоит из тычиночной нити и пыльника, разделенного на две половинки (теки). Тычинки короче пестика. Тычиночные нити своим основанием прикреплены к

основанию воронки венчика. Тычиночная нить прямая, цилиндрическая, короткая, голая, гладкая. Пыльник неподвижный, прямостоячий, с придатком у верхушки, раздвоенный у основания, по форме сердцевидно-продолговатый, теки сближенные. Место разрыва пыльника боковое. Гинецей представлен ценокарпным пестиком, образованным двумя плодолистиками. Завязь двухгнездная со многими семязачатками, верхняя, по форме округлая или яйцевидная. Поверхность завязи гладкая, голая. Столбик верхушечный, прямостоячий, длинный, тонкий. Рыльце верхушечное, двухлопастное, покрыто сосочками, выше тычинок. Имеются данные, что у длинностолбчатых форм лучше выражена сосочковая поверхность [Малецкий, 1996]. У данного образца длинностолбчатая форма цветка. Морфометрические параметры частей цветка представлены в таблице.

Цветок *F. ovata*

Цветок обоеполюй. Цветоножка короткая, боковая. Цветоложе плоское. Покров цветка расчленен на чашечку и венчик. Чашечка четырехрассеченная с опушением, прижата к венчику. Венчик состоит из трубки, которая составляет $\frac{1}{4}$ длины венчика, зева и отгиба. Трубка венчика прямая, короткая, отгиб четырехлопастной отклоненный. Андроей представлен двумя фертильными, свободными, прямыми, равными тычинками. Тычинки околопестичные. Тычиночная нить по форме шиловидная, длинная, голая, гладкая. На вершине тычиночной нити расположен неподвижный, прямостоячий, сердцевидный пыльник, состоящий из двух тек. Тычиночные нити прикреплены к основанию трубки венчика. Гинецей представлен ценокарпным пестиком, состоящим из двух сросшихся плодолистиков. Плодолистики срастаются до рылец. Пестик ниже тычинок. Завязь по форме эллиптическая, гладкая, голая, двухгнездная, верхняя. Столбик верхушечный, прямостоячий. Рыльце верхушечное, двухлопастное, каждая лопасть у которого полушаровидная. По положению в пространстве рыльца, его лопасти отогнутые. У данного образца *F. ovata* короткостолбчатая форма цветка. Морфометрические параметры частей цветка представлены в таблице.

Морфометрические параметры цветков *F. giraldiana* и *F. ovata*

[Morphometric parameters of *F. giraldiana* and *F. ovata* flowers]

Параметры цветка, М±m	<i>F. giraldiana</i>	<i>F. ovata</i>
Длина цветка, см	1.95±0.054	1.92±0.027
Длина лопасти лепестка, см	1.28±0.019	1.26±0.029
Ширина лепестка, см	0.63±0.011	0.51±0.009
Длина тычинки, мм	3.16±0.057	5.19±0.089
Длина пыльника, мм	1.91±0.030	1.69±0.031
Ширина пыльника, мм	1.53±0.013	1.50±0.013
Длина тычиночной нити, мм	1.58±0.042	3.71±0.095
Длина завязи, мм	1.59±0.043	1.48±0.028
Ширина завязи, мм	1.42±0.022	1.33±0.017
Длина столбика, мм	3.73±0.042	1.04±0.022

Экология цветения и опыления

Форзиции характеризуются гетеростилией по типу дистилии. В Ботаническом саду ИБ Коми НЦ УрО РАН они цветут в одно время, стремительно. Цветки раскрываются однократно.

***F. giraldiana*.** Цветение кустарника 9–18, цветка 7–15 дней (рис. 1). У данного образца наблюдается геркогамия, т.к. тычинки ниже пестика. Согласно опыту с окрашиванием KMnO_4 , рыльце готово воспринимать пыльцу к концу второго дня цветения. Пыльники вскрываются к концу первого дня цветения. Наблюдалась диогогамия в форме протандрии. Хотя в условиях интродукции в дендрарии Ботанического сада невозможно легитимное опыление в связи с тем, что каждый вид представлен только одной морфой, мы провели опыты на возможность автогамии и апомиксиса. В 2022 г. во время контролируемого опыления для преодоления геркогамии опылили пыльцой цветка с этого же растения. Семена не завязались. Для проверки межвидовой гибридизации и апомиксиса опылили пыльцой *F. ovata*. Семена завязались (межвидовая гибридизация либо факультативный апомиксис). Также наблюдали образование единичных плодов при свободном опылении с незначительным числом семян от одного до девяти. В 2023 г. образование плодов и семян при контролируемом опылении и при свободном опылении не произошло.

***F. ovata*.** Цветение кустарника 8–19, цветка 6–15 дней (рис. 2), в зависимости от метеоусловий года. Пыльники располагаются выше относительно рыльца пестика. После вскрытия пыльников вся желтая

пыльца высыпается на зеленоватое влажное рыльце. Пыльники вскрываются к концу первого дня цветения. Согласно опыту с окрашиванием $KMnO_4$, рыльце готово воспринимать пыльцу сразу же после распускания цветка (дихогамия в форме протогинии). Для проверки гейтоногамии нанесли на рыльце пыльцу цветка с этого же куста. Плодов не образовалось. Для проверки межвидовой гибридизации или апомиксиса в 2022 г. опылили пыльцой *F. giraldiana*. Плоды также не образовались. Но при свободном опылении произошло образование единичных плодов с незначительным числом семян от одного до шести. Все семена были всхожие. В 2023 г. образование плодов и семян как при контролируемом опылении, так и при свободном опылении не произошло.



Рис. 1. Цветки *F. giraldiana*
[Flowers *F. giraldiana*]



Рис. 2. Цветение *F. ovata*
[Flowering *F. ovata*]

У гетеростильных растений завязывание семян зависит от легитимности опыления. Легитимное опыление всегда перекрестное и происходит между различными морфами тогда, когда рыльце и пыльники находятся в одинаковом положении, например, короткий столбик и короткие тычинки (из длинностолбикового цветка). В условиях дендрария Ботанического сада легитимного опыления быть не может, т.к. каждый вид представлен только одной морфой. В случае принудительного самоопыления в форме автогамии семена не завязались у обоих видов. Это доказывает, что геркогамия и дихогамия не являются препятствием к самоопылению, а лишь дополнительными факторами, ограничивающими его. Данный факт указывает на несовместимость пыльцы и рыльца, т.е. физиологическую самостерильность, которая является наиболее универсальным приспособлением к перекрестному опылению [Демьянова, 2014]. Для видов форзиций характерна гетероморфная самонесовместимость [Малецкий, 1996]. Наблюдения по завязыванию семян при контролируемых опылениях показали, что у *F. giraldiana* возможна межвидовая гибридизация либо факультативный апомиксис. Также они, вероятно, возможны и для *F. ovata*. Хотя, в отличие от *F. giraldiana* в опыте с контролируемым опылением образование плодов не произошло, но все же при свободном опылении они образовались.

Гетеростилия является признаком семейств исключительно с биотическим опылением [Агаджанян, 2000]. Цветкам форзиций характерен синдром миофильного опыления, проявляющийся в простом, широко раскрытом венчике, светлой окраске, слабом запахе, легкодоступном нектаре и отчетливо выступающими наружу репродуктивными органами. Для привлечения насекомых-опылителей цветки используют целый арсенал аттракции: форму, цвет, запах, нектар, пыльцу. Наиболее привлекателен для насекомых нектар. Нектарники морфологически не выражены. Функцию нектарообразования и нектаровыделения выполняют стенки завязи. Добираясь до нектара, насекомое касается пыльников у длинностолбчатых образцов, затем при посещении короткостолбчатых цветков, пробираясь к нектару касается рыльца, перенося на него пыльцу. Нектар легкодоступен, и поэтому цветок легко опыляется насекомыми с короткими хоботками.

Форзиции обладают двумя типами визуальной аттракции – с помощью окраски и формы, т.е. величины цветка. Основным органом привлечения в цветке форзиций является желтый венчик. Наличие близко расположенных соседних цветков увеличивает их привлекательность. Как известно, окраска цветков является в большинстве случаев фактором дальнего действия. Такое оптическое действие основано преимущественно на цветовом контрасте цветка с окружающей обстановкой [Демьянова, 2011]. Цветение форзиций происходит до появления листьев как у самих кустарников, так и у окружающей древесной растительности. Имеются сведения о предпочтении двукрылыми желтых цветков [Мазохин-Поршняков, 1965]. Желтые цветки заметны для всех насекомых-опылителей, в том числе и для неспециализированных. Известно, что обычные мухи обладают способностью различать некоторые цвета (по

крайней мере желтый и голубой), и они оказывают предпочтение желтому цвету [Фегри, Ван дер Пейл, 1982]. Во время цветения форзиций все растение усыпано двукрылыми. В данный ранневесенний период нет конкуренции за опылителей, т.к. в это время в саду цветут только форзиции. Двукрылыми опыляются наименее специализированные из энтомофильных цветков.

Чем в большей степени начало и темпы фенофаз синхронизированы с климатическим ритмом района интродукции, тем успешнее происходит адаптация растений. Разные температурные условия весны незначительно повлияли на наступление и продолжительность фенологических фаз, а также на продолжительность вегетационного периода форзиций, которые обладают высокой зимостойкостью. Резкие колебания температуры в весенний период, как правило, не влияют на растения. Благодаря активному росту побегов у форзиции формируется хорошо развитая крона. По нашим наблюдениям, в суровые зимы однолетние побеги форзиций подмерзают, т.к. их рост продолжается до поздней осени, но следующей весной побеги быстро отрастают снова.

Заключение

Важно привлечение в культуру кустарников с высокой адаптированностью к неблагоприятным факторам среды, способных не только произрастать в суровых условиях, но и сохранять декоративность. Интерес в использовании экзотов в озеленении населенных пунктов очень велик. Форзиции обладают большим преимуществом по сравнению с другими используемыми в зеленом строительстве аборигенными и интродуцированными растениями из-за ранневесеннего цветения. Особенностью форзиций как растений с ранневесенним цветением является стремительное цветение. Форзиции характеризуются гетеростилией в форме дистилии. *F. giraldiana* в Ботаническом саду Института биологии Коми НЦ УрО РАН представлена короткостолбчатой формой, а *F. ovata* – длинностолбчатой. Отсутствие ежегодного плодоношения в изученных условиях интродукции связано с наличием только одной морфологической формы цветков как у *F. giraldiana*, так и у *F. ovata*. При контролируемом опылении цветка в опыте для установления возможности межвидовой гибридизации либо апомиксиса наблюдалось образование плодов с единичными семенами у *F. giraldiana*, так же и при свободном опылении. У *F. ovata* образование плодов произошло только при свободном опылении, что говорит как о возможности межвидовой гибридизации, так и факультативного апомиксиса у данных видов, что требует дополнительных исследований. Формирование единичных плодов со всхожими семенами у *F. giraldiana* и *F. ovata* происходит не ежегодно. Необходимо привлечение образцов других морфологических форм и видов и дальнейшее их изучение.

Список источников

1. Агаджанян А.М. Распространённость и распределение гетеростилии в системе покрытосеменных // Успехи современной биологии. 2000. Т. 120, № 4. С. 348–360.
2. Атлас Республики Коми по климату и гидрологии. М.: Дрофа, 1997. 115 с.
3. Гладкова В.Н. Порядок маслиновые (Oleales) // Жизнь растений. М., 1981. Т. 5, ч. 2. С. 371–375.
4. Демьянова Е.И. О постановке антропоэкологических наблюдений в условиях интродукции // Ботанический журнал. 2011. Т. 98, № 8. С. 1127–1134.
5. Демьянова Е.И. О полиморфизме некоторых гетеростильных растений лесостепного Зауралья // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2014. Вып. 2. С. 10–17.
6. Карпун Ю.Н. Субтропическая декоративная дендрология: справочник. СПб.: ВВМ, 2010. 580 с.
7. Коркешко А.Л. История паркового строительства на территории Сочи (1866–1969 гг.) // Доклады Сочинского отдела географического общества СССР. 1971. Вып. II. С. 364–376.
8. Куклина А. Золотое сияние форзиции // Цветоводство. 1995. № 2. С. 21–22.
9. Малецкий С.И. Гены самонесовместимости контролируют у цветковых растений перекрестное оплодотворение // Соросовский образовательный журнал. 1996. № 12. С. 19–25.
10. Маляровская В.И., Солтани Г.А., Кунина В.А. Морфо-биологическая характеристика представителей рода *Forsythia* Vahl в условиях влажных субтропиков России // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2020. № 65(5). С. 340–353. DOI: 10.30679/2219-5335-2020-5-65-340-353.
11. Мазохин-Поршняков Г.А. Зрение насекомых. М.: Наука, 1965. 262 с.
12. Минчичова Н. Весеннее золото Праги // Цветоводство. 2000. № 2. С. 22–23.
13. Пономарев А.Н. Изучение цветения и опыления растений // Полевая геоботаника. М.; Л., 1960. Т. 2. С. 9–19.
14. Скупченко Л.А. и др. Интродукция полезных растений в подзоне средней тайги Республики Коми. СПб.: Наука, 2003. 214 с.
15. Фегри К., Ван дер Пейл Л. Основы экологии опыления. М.: Мир, 1982. 384 с.
16. Федоров А.А., Артюшенко З.Т. Атлас по описательной морфологии высших растений. Цветок. Л.: Наука, 1975. 352 с.
17. Lingdi Liu et al. Metabolome analysis of genus *Forsythia* related constituents in *Forsythia suspensa*

leaves and fruits using UPLC-ESI-QQQ-MS/MS technique // PLOS ONE. 2022. June 28. | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269915>.

18. Robinsohn I. Die Farbungsreaction der Narben, Stigmatochromie, als morphologische Blütenuntersuchungen method // *Sitzungsber. Akad. Wiss.* 1924. Bd. 133, H. 6. S. 181–211.

19. Sansei Nishibe et al. The Biological Effects of Forsythia Leaves Containing the Cyclic AMP Phosphodiesterase 4 Inhibitor Phillyrin // *Molecules*. 2021. Vol. 26. Art. 2362. DOI: 10.3390/molecules26082362.

20. The International Plant Names Index = IPNI. URL: <http://www.ipni.org> (дата обращения: 23.12.2022).

21. The Plant List. URL: <http://www.theplantlist.org/> (дата обращения: 23.12.2022).

References

1. Aghajanyan A.M. [The prevalence and distribution of heterostyly in the angiosperm system]. *Uspechi sovremennoj biologii*. V. 120, No. 4 (2000): pp. 348–360. (In Russ.).

2. *Atlas Respubliki Komi po klimatu i gidrologii* [Atlas of the Komi Republic on climate and hydrology]. Moscow, Dorfa Publ., 1997. 115 p. (In Russ.).

3. Gladkova V.N. [The order of olives (Oleales)]. *Žizn' rastenij* [Plant life]. Moscow, 1981, V. 5(2), pp. 371–375. (In Russ.).

4. Demyanova E.I. [On the formulation of antecological observations in the conditions of introduction]. *Botaničeskij žurnal*. V. 98, No. 8 (2011): pp. 1127–1134. (In Russ.).

5. Demyanova E.I. [On the polymorphism of some heterostyle plants of the forest-steppe Trans-Urals]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 2 (2014): pp. 10–17. (In Russ.).

6. Karpun Yu.N. *Subtropičeskaja dekorativnaja dendrologija* [Subtropical decorative dendrology: a reference book]. St-Peterburg, VVM Publ., 2010. 580 p. (In Russ.).

7. Korkeshko A.L. [The history of park construction on the territory of Sochi (1866–1969)]. *Doklady Sočinskogo otdela geografičeskogo obščestva SSSR*. Iss. II (1971): pp. 364–365. (In Russ.).

8. Kuklina A. [Golden radiance of forsythia]. *Cvetovodstvo*. No. 2 (1995): pp. 21–22. (In Russ.).

9. Maletsky S.I. [Self-incompatibility genes control cross-fertilization in flowering plants]. *Sorosovskij obrazovatel'nyj žurnal*. No. 12 (1996): pp. 19–25. (In Russ.).

10. Malyarovskaya V.I., Soltani G., Kunina V.A. [Morphological and biological characteristics of representatives of the genus *Forsythia* Vahl in the humid subtropics of Russia]. *Plodovodstvo i vinogradorstvo Juga Rossii*. No. 65(5) (2020): pp. 340–353. DOI: 10.30679/2219-5335-2020-5-65-340-353. (In Russ.).

11. Masokhin-Porshnyakov G.A. *Zrenie nasekomych* [Insect vision]. Moscow, 1965. 262 p. (In Russ.).

12. Minchichova N. [Spring gold of Prague]. *Cvetovodstvo*. No. 2 (2000): pp. 22–23. (In Russ.).

13. Ponomarev A.N. [Study of flowering and pollination of plants]. *Polevaja geobotanika* [Field geobotany]. Moscow, Leningrad, AN SSSR Publ., 1960, V. 2, pp. 9–19. (In Russ.).

14. Skupchenko L.A., Mishurov V.P., Volkova G.A., Portnyagina N.V. *Introdukciya poleznykh rastenij v podzone srednej tajgi Respubliki Komi* [Introduction of useful plants in the subzone of the middle taiga of the Komi Republic]. St-Peterburg, Nauka Publ., 2003. 214 p. (In Russ.).

15. Fegri K., Van der Peil L. *Osnovy èkologii opylenija* [Fundamentals of pollination ecology]. Moscow, Mir Publ., 1982. 384 p. (In Russ.).

16. Fedorov A.A., Artyushenko Z.T. *Atlas po opisatel'noj morfologii vysšich rastenij, Cvetok* [Atlas of descriptive morphology of higher plants. Flower]. Leningrad, Nauka Publ., 1975. 352 p. (In Russ.).

17. Lingdi Liu, Yu Sun, Chunxiu WenID, Tao Jiang, Wei Tian et al. Metabolome analysis of genus *Forsythia* related constituents in *Forsythia suspensa* leaves and fruits using UPLC-ESI-QQQ-MS/MS technique. *PLOS ONE*. June 28 (2022). | DOI: 10.1371/journal.pone.0269915.

18. Robinsohn I. Die Farbungsreaction der Narben, Stigmatochromie, als morphologische Blütenuntersuchungen method. *Sitzungsber. Akad. Wiss.* Bd. 133, H. 6 (1924): S. 181–211.

19. Sansei Nishibe, Kumiko Mitsui-Saitoh, Junichi Sakai, Takahiko Fujikawa. The Biological Effects of Forsythia Leaves Containing the Cyclic AMP Phosphodiesterase 4 Inhibitor Phillyrin. *Molecules*. V. 26 (2021). Art. 2362. DOI: 10.3390/molecules26082362.

20. The International Plant Names Index. Available at: <http://www.ipni.org> (accessed 23.12.2022).

21. The Plant List. Available at: <http://www.theplantlist.org/> (accessed 23.12.2022).

Статья поступила в редакцию 02.09.2024; одобрена после рецензирования 21.10.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 02.09.2024; approved after reviewing 21.10.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторе

С. А. Мифтахова – канд. биол. наук, научный сотрудник отдела Ботанический сад.

Information about the author

S. A. Miftakhova - candidate of biological sciences, researcher of the Botanical Garden.

БОТАНИКА

Научная статья

УДК 582.623(470.53)

EDN JXWEXF

doi: 10.17072/1994-9952-2024-3-274-379



***Salix alba*, *S. euxina* и *S. × fragilis* (Salicaceae) в условиях
Пермского края**

Наталья Александровна Молганова^{1✉}, Сергей Александрович Овеснов²

^{1✉} Пермский государственный аграрно-технологический университет им. акад. Д. Н. Прянишникова,
Пермь, Россия, molganova@mail.ru

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия,
OvesnovSA@yandex.ru

Аннотация. Проведено исследование морфологических параметров листьев *Salix alba*, *S. euxina* и *S. × fragilis*. Для исследования в гербарии ПГНИУ (PERM) были отобраны образцы *S. alba*, подписанные И.В. Беляевой, чтобы избежать возможного включения гибридных растений. Побеги с культивируемых растений *S. euxina* и *S. × fragilis* собраны в августе 2024 г. в г. Перми. Модельные побеги отбирались из освещенной части кроны. На них измерены все вполне развитые, более или менее симметричные листья из центральной части прироста текущего года. Измерение листьев производили при помощи CorelDRAW 2019. Были измерены длина и ширина листовой пластинки, вычислен коэффициент ее формы как отношение ее длины к ширине, расстояние от основания листовой пластинки до ее наиболее широкой части, длина черешка, определен угол верхушки листовой пластинки. Статистическая обработка данных выполнена при помощи PAST 4.13. Установлено, что формы листовых пластинок у изученных видов имеют вполне определенные отличия, позволяющие достаточно уверенно дифференцировать близкородственные таксоны.

Ключевые слова: *Salix alba*, *Salix euxina*, *Salix × fragilis*, морфометрия листовой пластинки, Пермский край

Для цитирования: Молганова Н. А., Овеснов С. А. *Salix alba*, *S. euxina* и *S. × fragilis* (Salicaceae) в условиях Пермского края // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 374–379. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-374-379>.

BOTANY

Original article

***Salix alba*, *S. euxina* and *S. × fragilis* (Salicaceae) in the conditions
of the Perm Region**

Natalia A. Molganova^{1✉}, Sergey A. Ovesnov²

^{1✉} Perm State agricultural and technological University, Perm, Russia, molganova@mail.ru

² Perm State University, Perm, Russia, OvesnovSA@yandex.ru

Abstract. The study is devoted to morphological parameters of the leaves of *Salix alba*, *S. euxina* and *S. × fragilis*. *Salix alba* samples for the study were selected in the herbarium of the Perm State University (Perm) and signed by I.V. Belyaeva in order to avoid the possible inclusion of hybrid plants. Shoots from cultivated plants of *S. euxina* and *S. × fragilis* were collected in August 2024 in Perm. Model shoots were selected from the illuminated part of the crown. All fully developed, more or less symmetrical leaves from the central part of the current year's growth are measured on them. The length and width of the leaf blade leaves were measured using CorelDRAW 2019. The blade shape coefficient was calculated as the ratio of its length to width, the distance from the base of the leaf blade to its widest part, the length of the petiole, and the angle of the apex of the leaf blade was determined. Statistical data processing was performed using PAST 4.13. It was found that the shapes of leaf blades in the studied species have quite definite differences that allow us to fairly confidently differentiate closely related taxa.

Keywords: *Salix alba*, *Salix euxina*, *Salix × fragilis*, morphometry of the leaf blade, Perm region

For citation: Molganova N. A., Ovesnov S. A. [*Salix alba*, *S. euxina* and *S. × fragilis* (Salicaceae) in the conditions of the Perm Region]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 4 (2024): pp. 374–379. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-374-379>.

Введение

Виды рода *Salix* L. достаточно широко представлены в зеленых насаждениях в г. Перми. В местах озеленения общего пользования и на доступных для посещения территориях специального назначения в исследованиях прошлых лет был найден 21 вид и гибридогенный таксон из рода *Salix* (*Salicaceae*) [Овеснов, 2007; Молганова, Овеснов, 2017]. Большинство культивируемых видов рода – кустарники или невысокие деревья; лишь 4 вида являются крупными, до 20 м и более, одноствольными или немногоствольными деревьями – это *Salix alba* L., *S. fragilis* L. *S. × pendulina* Wender. и *S. euxina* I.V. Belyaeva.

Salix fragilis и *S. alba* отмечались еще в 1912 г. П.В. Сюзовым [Сюзов, 1912] в Пермской губернии, но первый из них – только для территории современной Челябинской обл. С 1997 г. вид указывается как редкий для южной части Пермского края, где он встречается в населенных пунктах и в поймах рек [Овеснов, 1997], тогда как *S. alba* отмечалась П.В. Сюзовым как повсеместный вид. *S. × pendulina* приводится в списке ассортимента ограниченного пользования [Шумихин, Черткова, Шумигаи, 2022]. *S. euxina* в г. Перми ранее не была отмечена.

Salix euxina

Под названием *S. fragilis* ранее приводилось два таксона – *Salix × fragilis* L. и *S. euxina* I.V. Belyaeva. Современное понимание этих таксонов предложено И.В. Беляевой [Belyaeva, 2009], хотя ее позицию разделяют не все исследователи этого рода [Marchenko, Kuzovkina, 2022]. И.В. Беляева предложила добавить к названию *Salix × fragilis* L. знака гибридного происхождения [Belyaeva, 2009], т.к. он является гибридом европейско-западносибирско-средиземноморского вида *Salix alba* L. и восточно-средиземноморского вида *Salix euxina*. Последний был описан в 2009 г. [Belyaeva, 2009]. Хотя это утверждение оспаривается некоторыми авторами [Marchenko, Kuzovkina, 2022], не вызывает сомнения необходимость выделения таксона с голыми листьями и ломкими в сочленениях побегами.

В г. Перми *S. euxina* в природных сообществах не найдена и представлена только в посадках одним культиваром – *S. euxina* ‘Bullata’, который впервые упоминался Францем Людвигом Шпетом в 1906 г. под названием *S. fragilis* var. *bullata* Spaeth. Еще он известен под названиями *S. fragilis* var. *sphaerica* Hryniewiczski (1933) и *S. fragilis* var. *capitata* Snarskis nom. inval. (1954) [Скворцов, 1968; POWO, 2024].

А.К. Скворцовым эта разновидность описывалась как «очень декоративная форма с ... плотной шаровидной, словно стриженной кроной» [Скворцов, 1968, с. 112]. Известны только мужские растения [Kuzovkina, 2015]. На Урале (в г. Свердловске (ныне – Екатеринбург)) этот культивар появился в 1959 г. благодаря усилиям В.И. Шабурова, который отмечал его перспективность для декоративного садоводства и разработал метод выращивания растения древовидного облика [Шабуров, 1986].

S. euxina – одноствольное или немногоствольное листопадное дерево, часто растущее кустовидно, достигающее высоты 15–18 м. Культивар ‘Bullata’ имеет острые углы отхождения конечных побегов, которые направлены к периферической части кроны. Крона, таким образом, шаровидная или формирует сферы вокруг крупных скелетных ветвей. Старая кора на стволах глубоко продольно трещиноватая. Молодые побеги легко обламываются в сочленениях, зеленоватые, сероватые, блестящие и голые. Почki мoнoмoрфнoе, прижатые к стеблю, желтоватые. Черешки составляют приблизительно 1/10 длины листовой пластинки, голые, с более или менее заметными субапикальными железками. Листья до 10 см длиной, продолговато-ланцетные, с широко-клиновидным основанием, острые на верхушке, грубо железисто-зубчатые по краю. На листе заметна сеть более светлых жилок. Листья всегда голые. Генеративных органов в условиях г. Перми не обнаружено.

Salix alba

S. alba L. – одноствольное или немногоствольное листопадное дерево до 30 м высотой и диаметром до 1 м. Побеги не ломкие, молодые – серебристо опушенные, позже оголяющиеся, желтые, бурые или коричневые. Ствол с глубоко продольно-трещиноватой корой. Листья 5–12 см длиной, продолговато-ланцетные, заостренные, по краям мелкопильчатые, с обеих сторон серебристо-шелковистые, сверху блестящие, на коротких черешках с железками в верхней части, близ основания пластинки. Большая доля растений, произрастающих в природных сообществах и в условиях культуры на территории Пермского края, имеет гибридное происхождение, что связано с распространенностью гибридного процесса. [Скворцов, 1968; Triest, 2001; Quataert, 2003; Stalažs, 2022].

Salix × fragilis

S. × fragilis L. (= *S. alba* × *S. euxina*) – одноствольное или немногоствольное листопадное дерево до 20–30 м высотой; молодые побеги негусто опушенные, позже оголяющиеся, бурые или оливково-желтые. Побеги ломкие в сочленениях, как у одного из родительских таксонов. Кора на побегах грубая, продольно трещиноватая. Листья ланцетные или линейно-ланцетные, длиннозаостренные на верхушке, ширококлиновидные или округлые у основания. Листья при распускании опушенные, на концах побегов

негусто опушены хотя бы единичными волосками до осени, зубчатые. Есть отдельные растения с более густым опушением, приближающиеся к *S. alba*. В г. Перми представлены и мужские, и женские растения. Цветки появляются одновременно с облиствением. Сережки 4–7 см длиной с прицветниками, мужские обычно несколько короче. Женские цветки с одним, а мужские – с двумя нектарниками. Прицветные чешуи бледные, равномерно опушены длинными волосками. Завязь голая, узко-коническая, на заметной ножке, Тычинок 2, иногда в отдельных цветках 3–4.

Salix × pendulina

S. × pendulina Wender. – листопадное дерево до 20 м высотой, с широкой кроной и раскидистыми плакучими ветвями. Кора на стволах трещиноватая. Побеги длинные, очень тонкие, голые, зеленоватые или желто-оранжевые, у основания слегка ломкие. Почки мелкие, заостренные, прижатые, голые. Листья 10–15 см длины, ланцетные, с клиновидным основанием и длиннозаостренной верхушкой, с 2–3 железками у основания, по краю мелко железисто-пильчатые. Черешки 0.5–1.5 см длины. Сережки 2–3 см длины и до 0,5 см ширины. Цветет в мае [Belyaeva I. V. et al., 2018]. *Salix × pendulina* представлена в г. Перми различными культиварами, из которых самые распространенные относятся к *S. × pendulina* f. *salamonii* (Carrière) I.V. Belyaeva: ‘Pamyati Bazhova’, ‘Pamyati Mindovskogo’, ‘Pamyati Shaburova’. Распространение и морфологические особенности культивируемых популяций требуют специального изучения.

Материал и методика исследования

В рамках данной работы было проведено исследование морфологических параметров листа видов *Salix alba*, *S. euxina* и *S. × fragilis*. Чтобы избежать возможного включения гибридных растений, для исследования были отобраны образцы *Salix alba*, подписанные И.В. Беляевой, хранящиеся в гербарии ПГНИУ (PERM). Культивируемые растения *S. euxina* и *S. × fragilis* отбирались в августе 2024 г. в г. Перми. Деревья *S. euxina* ‘Bullata’ имели плотную шаровидную крону, ломкие ветви и голые листовые пластинки [Kuzovkina, 2015; Belyaeva, 2009]. Видовая принадлежность *S. × fragilis* определялась по литературным источникам [Belyaeva, 2009, 2018]. Модельные побеги отбирались из освещенной части кроны. На них измерены все вполне развитые, более или менее симметричные листья из центральной части прироста текущего года. Поврежденные и искривленные листья не учитывались. На одном верхушечном или

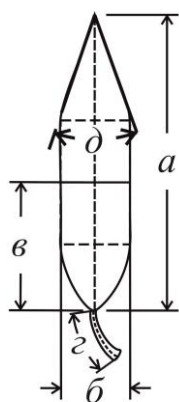


Рис. 1. Схема измерения параметров листа [The scheme for measuring sheet parameters]

боковом приросте текущего года в зависимости от степени развития пригодными для исследования оказывались от 3 до 7 листьев. Листья с гербарных образцов фотографировали с масштабной линейкой. У свежесобранных растений листья отделяли от побега, прижимали стеклом и фотографировали. Измерение листьев производили при помощи компьютерной программы CorelDRAW 2019, в которой после масштабирования фотографии использовали инструменты угловой и линейный размер. Были измерены длина (рис. 1; *a*) и ширина листовой пластинки (*b*). Вычислен коэффициент формы листовой пластинки как отношение ее длины к ширине. Измерялось расстояние от основания листовой пластинки до ее наиболее широкой части (*c*). Если листовая пластинка оставалась одинаково широкой на некотором отрезке, то расстояние измерялось до его середины. Коэффициент расположения наиболее широкой части листовой пластинки определен как отношение расстояния от основания листовой пластинки до ее наиболее широкой части к длине листовой пластинки. Поскольку черешок в гербарных образцах часто оказывался искривленным, длина черешка определялась как длина кривой линии (*e*), начерченной вдоль черешка при помощи инструментов CorelDRAW. Кроме того, в градусах определен угол верхушки листовой пластинки (*d*). Лучи, образующие угол, выходили из верхушки листовой пластинки и проходили вдоль ее обоих краев в верхней половине.

Статистическая обработка данных выполнена при помощи PAST 4.13. Normality tests по методу Шапиро-Уилкоксона показал, что нормальному распределению соответствуют не все параметры, таким образом для оценки различий между выборками был использован непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Средние показатели листьев приведены в таблице. Наиболее длинными оказались листовые пластинки *S. × fragilis* и *S. euxina* (достоверность различий между исследованными листьями не доказана). Листовые пластинки *S. alba* имеют меньшую длину и достоверно отличаются от других видов (таблица, рис. 2, а). К тому же, этот признак оказался у данного вида менее вариabельным – коэффициент вариации 13.90%, тогда как у *S. × fragilis* и *S. euxina* данный параметр составил 24.66 и 16.36% соответственно. Размах длины листовой пластинки *S. alba*, *S. euxina*, *S. × fragilis* составляет 44, 75 и 95 мм соответствен-

но. Согласно диагнозу, листовые пластинки *S. euxina* изменяются в пределах 65.0–85.0 мм [Belyaeva, 2009]. Листья культивируемых растений *S. euxina* 'Bullata' в условиях г. Перми крупнее – от 44 до 119 мм. Их средняя величина превышает максимальное значение в природе – 89.2 мм.

Ширина листовых пластинок и вариативность этого показателя увеличивается в ряду *S. alba* – *S. euxina* – *S. × fragilis*. Среднее взвешенное арифметическое приведено в таблице. Коэффициент вариации составляет у *S. alba*, *S. euxina* и *S. × fragilis* – 11.67, 18.12 и 31.10% соответственно. По данному признаку виды достоверно различаются при уровне значимости $p = 0.05$.

Средние арифметические показатели листьев *S. alba*, *S. euxina*, *S. × fragilis*
[Arithmetic averages of leaves *S. alba*, *S. euxina*, *S. × fragilis*]

Показатель	M±m		
	<i>S. alba</i>	<i>S. euxina</i>	<i>S. × fragilis</i>
Длина листовой пластинки, мм	74.0±1.6	89.2±1.2	90.5±3.5
Ширина листовой пластинки, мм	14.0±0.3	18.0±0.3	22.6±1.1
Коэффициент формы листовой пластинки	5.4±0.1	5.0±0.1	4.1±0.1
Коэффициент расположения наиболее широкой части	0.5±0.01	0.36±0.004	0.4±0.01
Длина черешка, мм	5.9±0.2	12.7±0.2	10.3±0.6
Угол верхушки листовой пластинки, градус	24.8±0.8	21.6±0.3	28.7±0.9

У *S. alba*, *S. euxina* длина превышает ширину в среднем в 5.4 и 5.0 раз соответственно. По этому признаку эта пара таксонов не различается. У *S. × fragilis* листья несколько шире – коэффициент формы в среднем составляет 4.1 и достоверно отличается от других таксонов при уровне значимости $p=0.05$.

Нижняя часть листовой пластинки у *S. euxina* и *S. alba* мало отличается. Наиболее широкая часть у *S. euxina* расположена на расстоянии 32.1±0.5 мм, а у *S. alba* – 33.3±0.8 мм. Несколько выше лежит наиболее широкая часть у *S. × fragilis* – 36.6±1.9 мм. Однако достоверность различий между выборками при уровне значимости $p = 0.05$ не подтверждается.

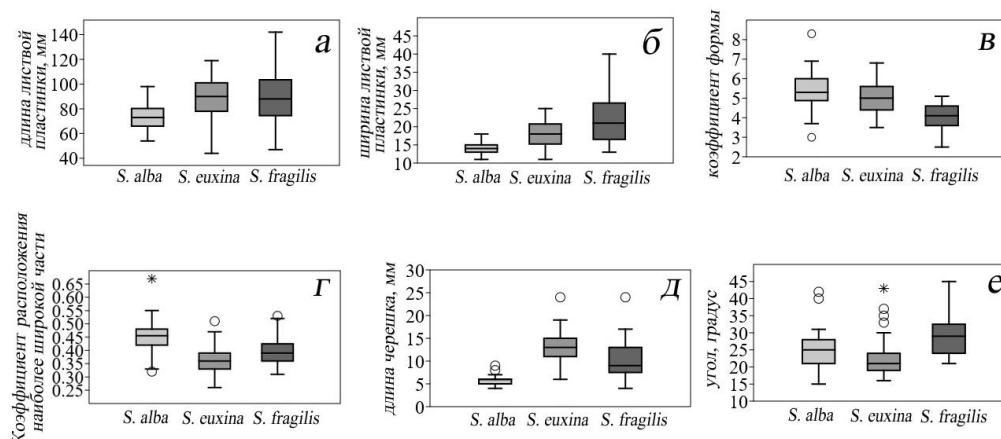


Рис. 2. Морфологические параметры листовых пластинок *S. alba*, *S. euxina*, *S. × fragilis*
[Morphological parameters of leaf blades *S. alba*, *S. euxina*, *S. × fragilis*]

Поскольку листья отличаются по длине, коэффициенты расположения наиболее широкой части имеют достоверные различия. Таким образом, форма листовых пластинок является, вероятно, таксоноспецифичным признаком. У *S. alba* наибольшая ширина расположена чаще всего на середине листовой пластинки. Однако в выборке имеются выбросы значений (рис. 2, в). Листья на верхушке и у основания прироста текущего года резко отличаются по данному признаку. Иногда в средней части побега тоже попадают листья с максимальной шириной много выше или ниже середины. Но поскольку их мало и отклонения наблюдаются в обе стороны, то они не влияют на меры центральной тенденции. Кроме того, стандартное квадратичное отклонение от среднего составляет всего 0.06 мм. У *S. euxina* наибольшая ширина находится несколько выше нижней трети листовой пластинки (таблица). У *S. × fragilis* этот признак находится посередине между родительскими таксонами.

Самая малая и мало вариабельная длина черешка у *S. alba*. Длина черешка изменяется от 4 до 9 мм. Коэффициент вариации составляет 16.41%. У *S. euxina* и *S. × fragilis* данный показатель составил 21.54% и 37.27% соответственно. У *S. euxina* черешок изменяется в широких пределах – от 6 до 54 мм. У *S. × fragilis* почти четверть измеренных листьев имела малый черешок (4–7 мм). При этом у нескольких ли-

ствий черешок превышает 20 мм. Распределение значений сильно отклоняется от нормального. Коэффициент асимметрии положительный (1.06). Для сравнения, коэффициент асимметрии у *S. alba* составляет 0.65, (p-value по Шапиро-Уилкоксону – 4.6×10^{-4}), а у *S. × fragilis* коэффициент асимметрии – 0.17 (p-value по Шапиро-Уилкоксону 0.01). Несоответствие распределения нормальному закону может объясняться тем, что длина черешка зависит от положения на побеге и экологических условий. Таким образом, этот вопрос требует проведения дополнительных исследований.

Верхушку листовой пластинки трудно описать формально и количественно. Однако можно наблюдать морфологические различия и констатировать статистически значимую разность величин углов верхушки листовой пластинки у всех таксонов. Наиболее острый угол верхушки листовой пластинки у *S. euxina* и *S. alba*, а у *S. × fragilis* угол несколько больше (таблица). У *S. alba* верхушка листа более всего близка к острой, а у *S. × fragilis* она ближе к заостренной, т.е. края листовых пластинок приходят к верхушке как вогнутые линии (кривые, идущие ниже своих хорд). В условиях Пермского края схемы листьев по усредненным значениям признаков для трех таксонов будут выглядеть следующим образом (рис. 3).

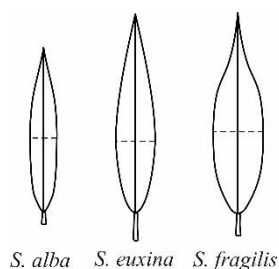


Рис. 3. Схемы листьев исследованных видов *Salix* по усредненным значениям
[Leaf diagrams of the studied species *Salix* by average values]

Заключение

Формы листовых пластинок у изученных видов имеют вполне определенные отличия. Листовые пластинки *S. alba* с серебристо-шелковистыми волосками, ориентированными параллельно главной жилке, чаще продолговатые (от ланцетных до обратно ланцетных или линейных), с острой верхушкой, длиной 54–98 мм и шириной 11–18 мм. Длина превышает ширину в 3–8 раз. Листовые пластинки *S. euxina* ‘Bullata’ голые, ланцетные, длиной 44–119 мм и шириной 11–25 мм, более крупные, нежели чем в природных условиях [Belyaeva, 2009]. Длина превышает ширину в 4–7 раз. Верхушка листовых пластинок острая или заостренная. Листовые пластинки *S. × fragilis* при распускании опушенные, ланцетные, редко яйцевидно-ланцетные, 47–142 мм длиной и 13–40 мм шириной, длина превышает ширину в 3–5 раз. Верхушка листовой пластинки заостренная. Эти признаки позволяют достаточно уверенно дифференцировать близкородственные таксоны.

Список источников

1. Молганова Н.А., Овеснов С.А. Конспект дендрофлоры г. Перми // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2017. Вып. 4. С. 390–402.
2. Овеснов С.А. Конспект флоры Пермской области. Пермь: Изд-во Перм. ун-та, 1997. 252 с.
3. Овеснов С.А. 1. Род *Salix* L. – Ива // Иллюстрированный определитель растений Пермского края. Пермь: Кн. мир, 2007. С. 279–301.
4. Скворцов А.К. Ивы СССР. М.: Наука, 1968. 265 с.
5. Сюзов П.В. Конспект флоры Урала в пределах Пермской губернии. М., 1912. 206 с.
6. Шабуров В.И. Коллекции ив в Ботаническом саду УНЦ АН СССР и некоторые аспекты их практического использования // Новые декоративные растения в культуре на Среднем Урале: сб. науч. тр. Свердловск, 1986. С. 69–83.
7. Шумихин С.А., Черткова М.А., Шумигай Д.Г. Живые коллекции растений Ботанического сада им. А.Г. Генкеля ПГНИУ. Пермь, 2022. 152 с.
8. Belyaeva I. Nomenclature of *Salix fragilis* L. and a new species, *S. euxina* (Salicaceae) // Taxon. 2009. Vol. 58, № 4. P. 1344–1348.
9. Belyaeva I. V. et al. The application of scientific names to plants in cultivation: *Salix vitellina* L. and related taxa (Salicaceae) // Skvortsovia. 2018. Vol. 4, № 2. С. 42–70.
10. Kuzovkina Y.A. Checklist for cultivars of *Salix* L. (willow): First version. International *Salix* Cultivar Registration Authority FAO – International Poplar Commission. 2015. 163 p.
11. Marchenko A.M., Kuzovkina Y.A. Notes on the nomenclature and taxonomy of *Salix fragilis* (Salicaceae) // Taxon. 2022. Vol. 71, № 4. P. 721–732.

12. POWO [Plants of the World Online]. *Salix* L. // Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. 2021. URL: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:325916-2> (accessed 13.08.2024).

13. Quataert P. et al. Diversity of the willow complex *Salix alba* – *S. × rubens* – *S. fragilis* // *Silvae Genet.* 2003. Vol. 52. P. 148–153.

14. Stalažs A. To be or not to be native: From the discourse on the official status of *Salix alba* to the recommendation to strengthen the protection of marginal populations in Latvia, with notes to related taxa // *Journal for Nature Conservation*. 2022. Vol. 67. Art. 126158. DOI: 10.1016/j.jnc.2022.126158.

15. Triest L. Hybridisation in staminate and pistillate *Salix alba* and *S. fragilis* (*Salicaceae*): morphology versus RAPDs // *Pl. Syst. Evol.* 2001. Vol. 226. P. 143–154.

References

1. Molganova N.A., Ovesnov S.A. [Checklist of trees and shrubs of Perm]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2017): pp. 390-402. (In Russ.).

2. Ovesnov S.A. *Konspekt flory Permskoj oblasti* [Summary of the flora of the Perm region]. Perm, PSU Publ., 1997. 252 p. (In Russ.).

3. Ovesnov S.A. [1. Genus *Salix* L. - Willow]. *Illjustrirovannyj opredelitel' rastenij Permskogo kraja* [Illustrated Key of Plants of Perm Region]. Perm, Knizhnyj Mir Publ., 2007. C. 279-301. (In Russ.).

4. Skvortsov A.K. *Ivy SSSR* [Willows of the USSR]. Moscow, Nauka Publ., 1968. 265 p. (In Russ.).

5. Syuzev P.V. *Konspekt flory Urala v predelach Permskoj gubernii* [Summary of the flora of the Urals within the Perm province]. Moscow, 1912. 206 p. (In Russ.).

6. Shaburov V.I. [Collections of willow trees in the Botanical Garden of the UNC of the USSR Academy of Sciences and some aspects of their practical use]. *Novye dekorativnye rastenija v kul'ture na Srednem Urale* [New ornamental plants in culture in the Middle Urals: a collection of scientific papers]. Sverdlovsk, 1986, pp. 69-83. (In Russ.).

7. Shumikhin S.A., Chertkova M.A., Shumigaj D.G. *Živye kollekcii rastenij Botaničeskogo sada im. A.G. Genkelja PGNIU* [The living collections of plants of the A.G. Genkel Botanical Garden of the PSNIU]. Perm, 2022. 152 p. (In Russ.).

8. Belyaeva I. Nomenclature of *Salix fragilis* L. and a new species, *S. euxina* (*Salicaceae*). *Taxon*. V. 58, No. 4 (2009): pp. 1344-1348.

9. Belyaeva I.V. et al. The application of scientific names to plants in cultivation: *Salix vitellina* L. and related taxa (*Salicaceae*). *Skvortsovia*. V. 4, No. 2 (2018): pp. 42-70.

10. Kuzovkina Y.A. Checklist for cultivars of *Salix* L. (willow): First version. International *Salix* Cultivar Registration Authority FAO - International Poplar Commission. 2015. 163 p.

11. Marchenko A.M., Kuzovkina Y.A. Notes on the nomenclature and taxonomy of *Salix fragilis* (*Salicaceae*). *Taxon*. V. 71, No. 4 (2022): pp. 721-732.

12. POWO [Plants of the World Online]. 2021. *Salix* L. // Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Available at: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:325916-2> (accessed 13.08.2024).

13. Quataert P., Breyne P., Goetghebeur P. and van Slycken G. Diversity of the willow complex *Salix alba* – *S. × rubens* – *S. fragilis*. *Silvae Genet.* V. 52 (2003): pp. 148-153.

14. Stalažs A. To be or not to be native: From the discourse on the official status of *Salix alba* to the recommendation to strengthen the protection of marginal populations in Latvia, with notes to related taxa. *Journal for Nature Conservation*. V. 67 (2022). Art. 126158. DOI: 10.1016/j.jnc.2022.126158.

15. Triest L. Hybridisation in staminate and pistillate *Salix alba* and *S. fragilis* (*Salicaceae*): morphology versus RAPDs. *Pl. Syst. Evol.* V. 226 (2001): pp. 143-154.

Статья поступила в редакцию 09.10.2024; одобрена после рецензирования 23.10.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 09.10.2024; approved after reviewing 23.10.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторах

Н. А. Молганова – канд. биол. наук, доцент;

С. А. Овеснов – д-р биол. наук, профессор.

Information about the authors

N. A. Molganova – candidate of biology, associate professor;

S. A. Ovesnov – doctor of biology, professor.

Вклад авторов:

Молганова Н. А. – концепция исследования; полевые исследования; обработка материала; написание текста статьи; итоговые выводы.

Овеснов С. А. – концепция исследования; полевые исследования; редактирование текста статьи; итоговые выводы.

Contribution of the authors:

Molganova N. A. – research concept; field research; material processing; writing the text of the article; final conclusions.

Ovesnov S. A. – research concept; field research; editing of the text of the article; final conclusions.

Научная статья

УДК 599

EDN LFNBP

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-380-389



Редкие млекопитающие Удмуртии: мониторинговый список

М. Н. Загуменов¹✉, В. И. Капитонов², М. Г. Останина³, А. А. Захарова⁴,
К. А. Тимрзянова⁵

^{1, 4, 5} Удмуртский государственный университет, Ижевск, Россия

² Тобольская комплексная научная станция УрО РАН, Тобольск, Россия

³ Центр гигиены и эпидемиологии в УР, Ижевск, Россия

Автор, ответственный за переписку: Михаил Николаевич Загуменов, micheyzag@mail.ru

Аннотация. Предлагается перечень (мониторинговый список) редких и уязвимых видов млекопитающих, не включенных в последнее издание Красной книги Удмуртской Республики, но нуждающихся в особом внимании к их состоянию в природной среде: *Cricetus cricetus*, *Eutamias sibiricus*, *Mustela eversmanii*, *Myodes rutilus*, *Sorex isodon*, *Sorex minutissimus*, *Spermophilus major*. Для каждого вида приводятся данные по современному распространению в Удмуртии и сопредельных регионах. Рекомендуется ведение мониторинга состояния локальных популяций указанных видов в республике.

Ключевые слова: млекопитающие, редкие виды, Красная книга, Удмуртская Республика

Для цитирования: Редкие млекопитающие Удмуртии: мониторинговый список / М. Н. Загуменов, В. И. Капитонов, М. Г. Останина, А. А. Захарова, К. А. Тимрзянова // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 380–389. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-380-389>.

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации «Биоразнообразие природных экосистем Заволжско-Уральского региона: история его формирования, современная динамика и пути охраны» (FEWS-2024-0011). Авторы искренне признательны С.В. Пучковскому (УдГУ), А.А. Лисовскому (ИПЭЭ РАН), Б.И. Шефтелю (ИПЭЭ РАН), Н.А. Щипанову (ИПЭЭ РАН) за помощь в видовой идентификации мелких млекопитающих; А.Г. Борисовскому (УдГУ), любезно передавшему сборы мелких млекопитающих, а также А.И. Бураковой, И.А. Вахрушеву, Л.Н. Гурьяновой, А.А. Дерюгину, С.Н. Евсееву, А.Н. Игнатевой, А.А. Кондратьеву, А.Г. Меньшикову, Д.Ю. Соколову, Д.М. Учанову за переданные сведения о встречах редких видов млекопитающих.

ZOOLOGY

Original article

Rare mammals of Udmurtia: monitoring list

М. N. Zagumenov¹✉, V. I. Kapitonov², M. G. Ostanina³, A. A. Zakharova⁴,
K. A. Timrzyanova⁵

^{1, 4, 5} Udmurt State University, Izhevsk, Russia

² Tobolsk Complex Scientific Station, Ural Branch of the RAS, Tobolsk, Russia

³ Center for Hygiene and Epidemiology in the Udmurt Republic, Izhevsk, Russia

Corresponding author: Mikhail N. Zagumenov, micheyzag@mail.ru

Abstract. We propose a monitoring list of rare and vulnerable species of mammals not included in the latest edition of the Red Book of the Udmurt Republic, but requiring special attention to their condition in the natural environment: *Cricetus cricetus*, *Eutamias sibiricus*, *Mustela eversmanii*, *Myodes rutilus*, *Sorex isodon*, *Sorex minutissimus*, *Spermophilus major*. For each species, data on the current distribution in Udmurtia and surrounding regions are provided. We recommend to monitoring the state of local populations of these species in the republic.

Keywords: mammals, rare species, Red Book, Udmurt Republic

For citation: Zagumenov M. N., Kapitonov V. I., Ostanina M. G., Zakharova A. A., Timrzyanova K. A. [Rare mammals of Udmurtia: monitoring list]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 4 (2024): pp. 380–389. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-380-389>.

Acknowledgments: the work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation “Biodiversity of natural ecosystems of the Trans-Volga-Ural region: the history of its formation, modern dynamics and ways of protection” (FEWS-2024 -0011). The authors are sincerely grateful to S.V. Puchkovsky (UdSU), A.A. Lisovsky (IEE RAS), B.I. Sheftel (IEE RAS), N.A. Shchipanov (IEE RAS) for assistance in species identification; A.G. Borisovsky (UdSU), who kindly handed over the collections of small mammals, as well as A.I. Burakova, I.A. Vakhrushev, L.N. Guryanova, A.A. Deryugin, S.N. Evseev, A. N. Ignatyeva, A.A. Kondratyev, A.G. Menshikov, D.Yu. Sokolov, D.M. Uchanov for the information provided about encounters with rare species of mammals.

Введение

В конце 2023 г. вышло 3-е издание Красной Книги Удмуртии [Красная ..., 2023]. В него вошли 13 видов млекопитающих. Один вид имеет нулевую категорию статуса редкости, три – первую, два – вторую, шесть – третью и один – четвертую. Впервые в Красную книгу региона были занесены два вида – малый нетопырь (*Pipistrellus pygmaeus* Leach, 1825), отмеченный в регионе в 2017 г. [Снитко, Снитко, 2018], и сибирская косуля (*Capreolus pygargus* Pallas, 1773).

В отличие от 1-го и 2-го изданий, в 3-е издание не вошёл так называемый «тревожный список» (в 1-м издании [Красная ..., 2001б]), он же – «Перечень видов животных и растений, не включенных в Красную книгу Удмуртской Республики, подлежащих мониторингу» (Далее – «Перечень...») во 2-м [Красная ..., 2012]. Комиссией по Красной Книге данное решение было принято в связи с тем, что включение такого списка, пусть и в приложении, вносит определенную путаницу в понимание того, считать ли вид охраняемым в регионе, или нет. Отсутствует аналогичный перечень и во 2-м издании Красной книги Российской Федерации [Красная ..., 2021]. В издании 2001 г. [Красная ..., 2001а] присутствовал аннотированный перечень таксонов и популяций, нуждающихся в особом внимании к их состоянию в природной среде. Отметим, что составление «тревожного списка» позволяет обращать особое внимание на эти виды при мониторинговых работах. К примеру, в Приложении 2 ко 2-му изданию Красной Книги Удмуртии [Красная ..., 2012] были приведены 39 видов позвоночных животных, 6 из которых теперь включены в актуальное издание Красной Книги республики. Данные об этих видах были собраны, в том числе, и в ходе ежегодных мониторинговых работ по редким видам.

Цель данной работы – изучить ситуацию в Удмуртии и сопредельных регионах с теми видами, которые нуждаются в мониторинге. По результатам мониторинга будет приниматься решение о включении их в последующее издание Красной книги Удмуртии.

Результаты и их обсуждение

Приведем виды млекопитающих, которые включались в «тревожный список» в 1-м издании Красной книги Удмуртии. Это 5 видов: равнозубая бурозубка (*Sorex isodon* Turov, 1924), крошечная бурозубка (*Sorex minutissimus* Zimmermann, 1780), сибирская косуля, степной сурок, или байбак (*Marmota bobak* Müller, 1776), обыкновенный хомяк (*Cricetus cricetus* L., 1758) [Красная ..., 2001б].

В «Перечень...» во 2-м издании Красной Книги Удмуртии включены 5 видов млекопитающих. Это равнозубая бурозубка, сибирская косуля, азиатский бурундук (*Eutamias sibiricus* Laxmann, 1769), обыкновенный хомяк, красная полевка (*Myodes rutilus* Pallas, 1779) [Красная ..., 2012].

По сравнению с 1-м изданием из «тревожного списка» были исключены крошечная бурозубка и байбак. Крошечная бурозубка отмечалась в республике более 50 лет назад [Ковалевский и др., 1969], после находки этого вида в Удмуртии отсутствовали, вследствие чего вид был исключён из «тревожного списка» как возможно исчезнувший в пределах республики. Степной сурок, интродуцированный в республике вид, напротив, стал активнее расселяться в южных районах Удмуртии [Загуменов, 2015]. Согласно методическим рекомендациям по ведению Красной книги субъекта Российской Федерации [Методические рекомендации ..., 2006], акклиматизированные виды и виды с нерегулярным обитанием на изучаемой территории не следует вносить в Красную книгу. Это послужило причиной исключения байбака из «Перечня...».

Два вида млекопитающих – азиатский бурундук и красная полевка – были добавлены во 2-м издании Красной книги.

Сибирская косуля, как было сказано выше, включена в 3-е издание Красной книги республики. Ситуацию с остальными видами, входившими в «тревожный список» и «Перечень...», мы рассмотрим подробнее.

Крошечная бурозубка (*Sorex minutissimus* Zimmermann, 1780), семейство Землеройковые, отряд Насекомоядные. Имеет обширный ареал, включающий таёжную зону Евразии от Скандинавии до побережья Тихого океана, Аляску [Павлинов, 2019]. В пределах ареала повсеместно редка, встречается спорадически [Павлинов, 2019]. Занесена в Красную Книгу Республики Татарстан [Красная ..., 2016], анно-

тированный перечень таксонов и популяций объектов животного мира, нуждающихся в особом внимании к их состоянию в природной среде в Приложении 1 Красной Книги Республики Башкортостан [Красная ..., 2014a]; в «Список редких и уязвимых видов животных, растений и грибов, не внесенных в Красную книгу Кировской обл., но нуждающихся на территории области в постоянном контроле и наблюдении» Красной книги Кировской области [Красная ..., 2014b]. В Пермском крае встречается редко [Животный мир Прикамья, 1989], в списки охраняемых не внесен.

Как было отмечено выше, ранее вид регистрировался на территории Удмуртии только в 60-е гг. XX в. [Ковалевский и др., 1969]. В мае-октябре 2022 г. доцентом УдГУ к.б.н. А.Г. Борисовским проводился сбор материала по жесткокрылым-герпетобионтам в окрестностях д. Непременная Лудзя Завьяловского р-на. Отлов производился методом линий ловчих стаканов объемом 0.33 л, которые вкапывались в землю и на 1/3 заполнялись водой с добавлением формалина. Попутно с насекомыми в ловчие стаканчики также попадали и мелкие млекопитающие. Всего было отловлено 512 микромамманий, 159 грызунов и 353 землеройки рода *Sorex*. 12 зверьков (3.4%) были определены нами как крошечные бурозубки. Определение было подтверждено д.б.н. С.В. Пучковским (УдГУ). Зверьки были пойманы в смешанном лесу, типичном местообитании вида [Ивантер, Макаров 2001] (рис. 1).

Таким образом, было подтверждено обитание вида в республике. Как повсеместно редкий вид, крошечная бурозубка предлагается нами к мониторингу. Требуется выявление новых мест обитания зверьков.

Равнозубая бурозубка (*Sorex isodon* Turov, 1924), семейство Землеройковые, отряд Насекомоядные. Вид имеет широкий ареал в пределах таёжной зоны [Павлинов, 2019]. На территории европейской части России встречается редко, занесена в ряд региональных красных книг [Красная ..., 2015; Красная ..., 2018]. Занесена в аннотированный перечень таксонов и популяций объектов животного мира, нуждающихся в особом внимании к их состоянию в природной среде в Приложении 1 Красной Книги Республики Башкортостан [Красная ..., 2014a]. В Кировской обл. отмечена в отдельных районах, распространение не изучено [Сотников, 2022]. В Пермском крае численность выше, в горно-таёжных лесах региона по численности в отдельные годы сравнима с обыкновенной бурозубкой [Животный мир Прикамья, 1989]. Типичный обитатель темной хвойной и боровой тайги [Павлинов, 2019].

Равнозубая бурозубка ранее на территории Удмуртии отмечалась в Малопургинском р-не в 60-е гг. XX в. [Ковалевский и др., 1969] и в середине 90-х гг. XX в. [Капитонов и др., 1999]. В 2020–2022 гг. 5 экземпляров этого вида были отловлены в окрестностях пос. Дзякино Глазовского р-на, на границе между Глазовским и Ярским р-нами [Захарова, Загуменов, 2022]. Зверьки были отловлены методом ловчего забора (4 экземпляра), либо давилками типа «Геро» (1 экземпляр) в свойственном виду биотопе – сосново-еловом лесу (рис. 1). Определение вида было подтверждено д.б.н. С.В. Пучковским.

Лимитирующим фактором для данного вида является вырубка, а также деградация спелых хвойных лесов [Красная ..., 2018].

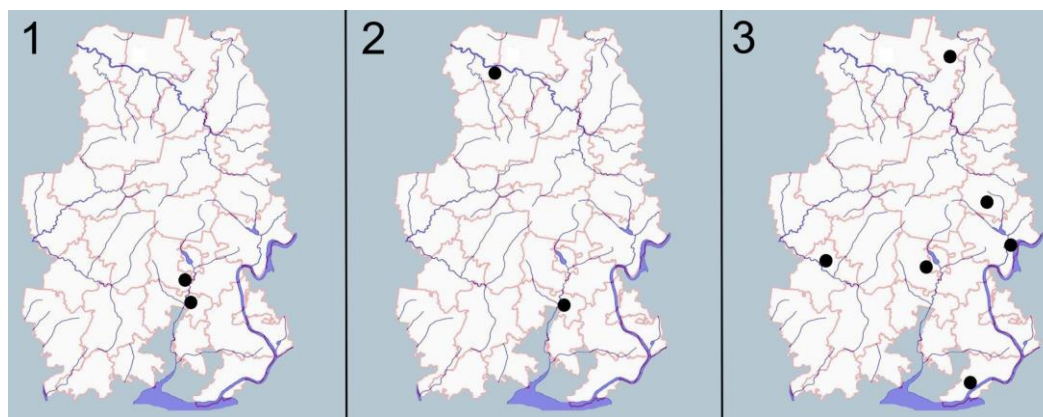


Рис. 1. Места встреч *Sorex minutissimus* (1), *Sorex isodon* (2) и *Eutamias sibiricus* (3) в Удмуртии.

● – место встречи либо отлова вида

[Sites where *Sorex minutissimus* (1), *Sorex isodon* (2) and *Eutamias sibiricus* (3) are met in Udmurtia.

● – sites of capture]

Азиатский бурундук *Eutamias sibiricus* Laxmann, 1769), семейство Белчьи, отряд Грызуны. Как и предыдущий рассмотренный вид, бурундук имеет обширный ареал в пределах таёжной зоны Евразии. Юго-западная граница распространения проходит по южному краю южно-таёжных лесов и пересекает подтайгу по левобережью р. Волги и правому берегу р. Камы [Оболенская, 2008]. Населяет темныхвойные и лиственничные леса с обильным подростом кустарника, ветровалами [Павлинов, 2019]. Занесен в Красную книгу Республики Татарстан [Красная ..., 2016], имеет 3-ю категорию статуса редкости как ред-

кий вид, находящийся на границе видового ареала. Включен в «Список редких и уязвимых видов животных, растений и грибов, не внесенных в Красную книгу Кировской области, но нуждающихся на территории области в постоянном контроле и наблюдении» Красной книги Кировской обл. [Красная ..., 2014б].

В Удмуртии азиатский бурундук ранее отмечался во всех районах. В кратком обзоре фауны млекопитающих Удмуртии [Капитонов и др., 1997] авторы отмечают, что вид в конце XX в. стал встречаться реже. В последние три десятилетия достоверная информация о встрече вида поступала из 6 точек (рис. 1): с территории Бalezинского (Меньшиков А.Г., личное сообщение), Вавожского (Вахрушев И.А., личное сообщение), Воткинского [Пучковский, 1996], Каракулинского (Капитонов К.А., личное сообщение) и Шарканского (Гурьянова Л.Н., личное сообщение) р-нов, также зверёк отмечался в лесопарковой зоне г. Ижевска [Георги, 2007].

Лимитирующим фактором для данного вида является, вероятно, сокращение площади потенциальных местообитаний – спелых хвойных лесов.

Обыкновенный хомяк (*Cricetus cricetus* L., 1758), семейство Хомяковые, отряд Грызуны. Распространён в лесостепи, а также в разнотравных степях Евразии от Бельгии до Алтая и Северного Сибиря. В настоящее время ареал стремительно сокращается [Surov et al., 2016], хомяк имеет природоохранный статус на территории ряда регионов России [Лисовский и др., 2019]. В граничащих с Удмуртской Республикой регионах не охраняется. В Кировской обл. является немногочисленным видом [Сотников, 2022]. В Пермском крае ещё в конце 80-х гг. XX в. было отмечено снижение численности вида [Животный мир Прикамья, 1989].

В Удмуртии обыкновенный хомяк находится близ северной границы видового ареала, населяет преимущественно пойменные и суходольные луга, а также окультуренные земли, включая селитебные зоны населённых пунктов [Капитонов, Загуменов, 2016].

В середине прошлого столетия хомяк встречался во всех районах республики, а в местах с высокой численностью приносил значительный ущерб сельскому хозяйству. Зверек имел промысловое значение, в отдельные годы заготавливалось более 20 000 шкур [Кирисов, 1969]. В последующие годы ресурсы хомяка в республике стали постепенно сокращаться, возможно, вследствие продолжительного интенсивного промысла и применения пестицидов. Спаду численности локальных популяций вида могло способствовать и создание Воткинского и Нижнекамского водохранилищ на р. Каме, в результате которого значительные площади пойменных угодий, благоприятных для обитания зверьков, оказались затопленными водой [Капитонов, Загуменов, 2016].

В последние годы участились сообщения, получаемые от местных жителей, о встречах с обыкновенным хомяком в населённых пунктах и садоводческих кооперативах. В основном эти свидетельства относятся к южной половине Удмуртии, расположенной в зоне смешанных лесов, есть сведения и о встречах зверьков в северных районах республики, расположенной в подзоне южной тайги (рис. 2). В Удмуртии встречаются хомяки рыжей и черной морф, преобладают зверьки черной морфы [Учанов, 2022].

Лимитирующим фактором для этого вида считается применение пестицидов в сельском хозяйстве [Животный мир Прикамья, 1989].

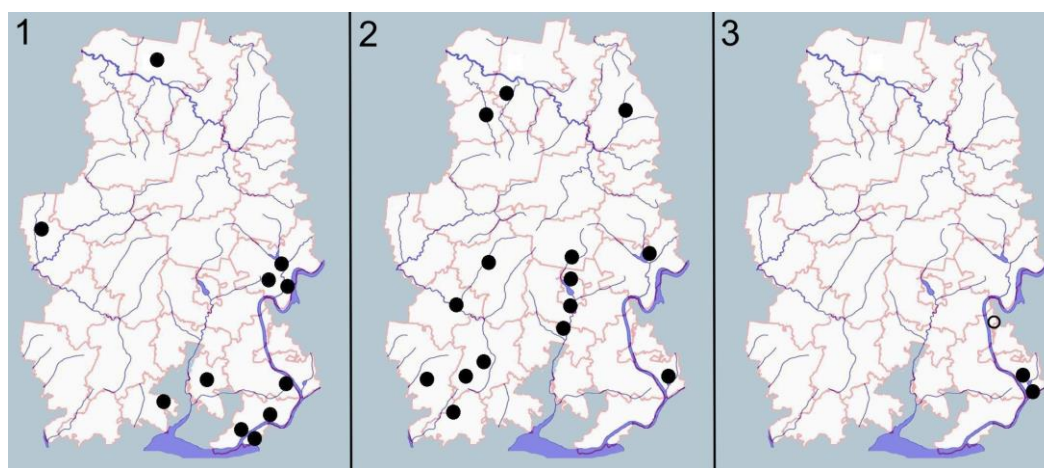


Рис. 2. Места встреч *Cricetus cricetus* (1), *Myodes rutilus* (2) и *Spermophilus major* в Удмуртии (3).

● – место встречи либо отлова вида; жилое поселение большого суслика. ○ – покинутое поселение *Spermophilus major*

[Sites where *Cricetus cricetus* (1), *Myodes rutilus* (2) and *Spermophilus major* (3) are met in Udmurtia.

● – sites of capture; habitable settlements and ○ – abandoned settlement of *Spermophilus major*]

Красная полевка (*Myodes rutilus* Pallas, 1779), семейство Хомяковые, отряд Грызуны. Имеет широкий ареал: таёжная зона Евразии от Скандинавии до Чукотки [Павлинов, 2019]. В целом, является многочисленным видом в России [Лисовский и др., 2019]. В европейской части страны населяет темнохвойные и хвойно-широколиственные леса, граница распространения преимущественно совпадает с ареалом пихты сибирской (*Abies sibirica*). Может обитать в жилых и хозяйственных постройках [Громов, Ербаева, 1995]. В настоящее время в ряде регионов Европейской части России наблюдается снижение численности вида, что стало основанием для внесения красной полевки в региональные Красные книги [Красная ..., 2010; Красная ..., 2014в], в том числе Республики Татарстан [Красная ..., 2016]. Аналогичная ситуация сложилась в Республике Мордовия [Андрейчев, Кузнецов, 2012]. Среди причин сокращения численности полевки называют вырубку старовозрастных хвойных лесов. Отмечается, что для вида характерны значительные (в 2–3 раза) колебания численности, причём в Европейской части России красная полевка испытывает более сильные депрессии, чем рыжая (*Myodes glareolus*) [Громов, Ербаева, 1995].

В Удмуртской Республике красная полевка распространена по всей территории [Капитонов и др., 1997] (рис. 2). Можно отметить, что вид ранее был обычным: по данным отловов, проведенных в 80-е гг. XX в, численность достигала 14-16 особей на 100 ловушко-суток в елово-пихтовых лесах с примесью липы [Бернштейн и др., 1984]. В XXI в. вид стал встречаться реже: в выпускных квалификационных работах студентов-биологов УдГУ упоминаний об отлове этого вида нет. В коллекции кафедры ботаники, зоологии и биоэкологии УдГУ хранятся 9 образцов красной полевки (череп и тушки), отловленные в Удмуртии. Для сравнения, рыжих полевок хранится 403 образца.

Красная полевка является одним из видов-резервуаров хантавируса, вызывающего геморрагическую лихорадку с почечным синдромом, а также других инфекций [Малькова, Рубцова, 2016; Лисовский и др., 2019]. По этой причине мониторинг мелких млекопитающих, включая этот вид, ведется сотрудниками ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в УР». На рис. 2 представлены места отловов красной полевки в 2006-2023 г. по данным ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в УР». В указанный период в республике отлавливались от 1 до 58 особей красной полевки в год.

Лимитирующим фактором для данного вида, как отмечают в работе по экологии красной полевки в Финноскандии Э.В. Ивантер и Е.А. Моисеева [2015], является рубка спелых хвойных лесов.

Кроме видов, занесенных в «Перечень...» во 2-м издании Красной книги Удмуртии, мы предлагаем включить в число видов, подлежащих мониторингу, большого суслика (*Spermophilus major* Pallas, 1779) и степного хорь (*Mustela eversmanii* Lesson, 1827).

Большой суслик (*Spermophilus major* Pallas, 1779), семейство Беличьи, отряд Грызуны. Населяет равнинные луговые степи от Волго-Вятского междуречья до Ишима [Павлинов, 2019]. Встречается в Республике Татарстан [Попов, Лукин, 1988], Республике Башкортостан [Животный мир Башкортостана, 1995], южных районах Кировской обл. [Сотников, 2022]. В граничащих с Удмуртской Республикой регионах не охраняется.

В Удмуртской Республике впервые отмечен в 1992 г. [Капитонов и др., 1994] в Камбарском р-не. В последующие годы распространился в пойме левобережья р. Камы до северной части Сарапульского р-на – зверьки встречались в урочище Рычино (Меньшиков А.Г., личное сообщение). В ходе обследования данной территории в 2008 и 2015 гг. суслики обнаружены не были. В начале XXI в. проводились специальные исследования вида [Капитонов и др., 2005; Капитонов, 2013]. В последние годы численность упала: в ходе исследований в 2020 г. в окрестностях г. Камбарки обнаружена единственная нора суслика (Игнатьева А.Н., личное сообщение). В настоящее время известен из окрестностей с. Шолья (Дерюгин А.А., личное сообщение), с. Балаки (Буракова А.И., личное сообщение) Камбарского р-на, урочища Мальяши Каракулинского р-на (Евсеев С.Н., личное сообщение) (рис. 2). Места обитания подверглись значительной антропогенной трансформации: в пойме р. Кама и Буй велось строительство автомобильных дорог. Кроме того, негативно на численности сусликов могло сказаться прекращение выпаса скота в местах обитания зверьков.

Степной хорь (*Mustela eversmanii* Lesson, 1827), семейство Куньи, отряд Хищные. Встречается в южных районах Центральной и Восточной Европы, степной и лесостепной зоне России, Казахстане, Средней Азии, Северо-Восточном Китае. Населяет преимущественно открытые и слабо облесенные территории [Павлинов, 2019]. В XX в. наблюдалось активное расселение в северном и западном направлениях [Аристов, Барышников, 2001]. Внесен в ряд региональных Красных книг [Лисовский и др., 2019]. Встречается в Республике Татарстан [Попов, Лукин, 1988], Республике Башкортостан [Животный мир Башкортостана, 1995], южных районах Пермского края [Животный мир Прикамья, 1989]. В сопредельных с Удмуртской Республикой регионах не охраняется.

В Удмуртской Республике вид стал встречаться в первой половине XX в [Капитонов и др., 1997]. В ходе наших исследований находки степного хорь были сделаны в юго-восточных районах Удмуртии, Каракулинском (Соколов Д.Ю., личное сообщение) и Камбарском [Капитонов и др., 1994] (рис. 3). Име-

ются опросные сведения о встречах степного хорь в конце прошлого столетия в Кизнерском, Воткинском, Можгинском и Завьяловском р-нах [Капитонов и др., 1994, 1997].

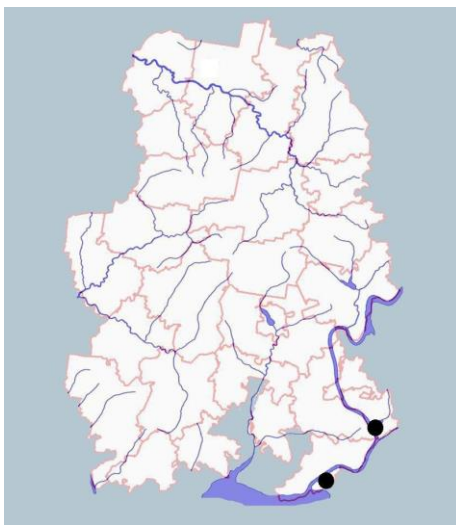


Рис. 3. Места встреч *Mustela eversmanii* в Удмуртии.

● – место встречи либо отлова вида

[Sites where *Mustela eversmanii* is met in Udmurtia.

● – sites of capture]

Степной хорь предлагается нами к мониторингу по причине экологической связи с большим сусликом, также предлагаемым к занесению в «тревожный список». Суслики являются основным объектом питания хорька [Попов, Лукин, 1988; Павлинов, 2019]. В связи с отмеченной тенденцией расширения ареала [Аристов, Барышников, 2001; Павлинов, 2019] возможны встречи и в других районах Удмуртии.

Заключение

Среди рассмотренных нами видов равнозубая бурозубка, азиатский бурундук и красная полевка являются типичными обитателями темнохвойной тайги. Снижение численности этих видов может быть связано с депрессией вследствие климатических изменений [Ведерников, 2023], поражением патогенами и инвазивными видами дендрофагов [Дедюхин, Титова, 2021; Ведерников, 2024] и вырубкой старовозрастных хвойных лесов.

Следующие виды – степной хорь, большой суслик и обыкновенный хомяк – являются степными и лесостепными млекопитающими. Угрозы для данных видов связаны с антропогенным воздействием на окружающую среду. Для хомяка – это применение современных рентицидов; для большого суслика – прекращение выпаса скота, а также разрушение местообитаний. Снижение численности сусликов, в свою очередь, может негативно сказаться на численности хоря. Отметим, что степной хорь и суслик находятся в Удмуртии на краю ареала, следовательно, могут наблюдаться значительные колебания численности.

Крошечная бурозубка – широко распространенный, но повсеместно редкий вид. Обнаружение этого вида в 2022 г. стало первым с 60-х гг. XX в.

Поскольку для всех рассмотренных видов существует угроза снижения численности в Удмуртии, мы рекомендуем ведение мониторинга их состояния в рамках ежегодных полевых исследований.

Список источников

1. Алексеев С.К., Ручин А.Б., Артаев О.Н. Заметки по фауне мелких млекопитающих (Rodentia, Insectivora), попадающих в почвенные ловушки // Тр. Мордовского Государственного природного заповедника им. П.Г. Смирдовича. 2013. Вып. 11. С. 234–240.
2. Андрейчев А.В., Кузнецов В.А. Об изменении списка и категорий млекопитающих в Красной книге Республики Мордовия // Известия Самарского научного центра РАН. 2012. Т. 14, № 5. С.163–167.
3. Аристов А.А., Барышников Г.Ф. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Хищные и ластоногие. СПб., 2001. 560 с.
4. Бернштейн А.Д., Апекина Н.С., Копылова Л.Ф. Особенности популяций красной и рыжей полевок на юге Удмуртии // Вид и его продуктивность в ареале. Свердловск, 1984. Ч. 1. С. 10–11.

5. Ведерников К.Е. Еловые насаждения Удмуртии в условиях меняющегося климата // Эффективный ответ на современные вызовы с учетом взаимодействия человека и природы, человека и технологий: социально-экономические и экологические проблемы лесного комплекса: материалы XIV междунар. науч.-техн. конф. Екатеринбург, 2023. С. 33–38.
6. Ведерников К.Е. Состояние темнохвойных лесов Удмуртской Республики (на примере зеленомошной группы) // Международный научно-исследовательский журнал. 2024. № 1(139). С. 1–8.
7. Георги Б.М. *Eutamias sibiricus* / Млекопитающие России. 2007. URL: <https://rusmam.ru/data/view?id=2516>.
8. Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб.: Наука, 1995. 641 с.
9. Дедюхин С.В., Титова В.В. Обнаружение уссурийского полиграфа (*Polygraphus proximus* Blandford, 1894) (Coleoptera, Curculionidae: Scolytinae) в Удмуртии // Журнал биологических инвазий. 2021. № 2. С. 32–39. DOI: 10.35885/1996-1499-2021-14-2-32-39
10. Животный мир Башкортостана: 2-е изд. перераб. и доп. / под ред. М.Г. Баянова и Е.В. Кучерова. Уфа: Китап, 1995. 312 с.
11. Животный мир Прикамья / сост. А.И. Шураков, Г.А. Воронов, Ю.Н. Каменский. Пермь: Кн. изд-во, 1989. 193 с.
12. Загуменов М.Н. Современное распространение степного сурка в Удмуртии через 30 лет после интродукции // Вестник Удмуртского университета Сер. Биология. Науки о Земле. 2015. Т. 25, вып. 3. С. 41–50.
13. Захарова А.А., Загуменов М.Н. Мелкие млекопитающие Глазовского района Удмуртии // Биологические науки и биоразнообразие: материалы II Всерос. науч.-практ. конф. Киров, 2022. С. 10–17.
14. Ивантер Э.В., Макаров А.М. Территориальная экология землероек-бурозубок (Insectivora, *Sorex*). Петрозаводск: ПетрГУ, 2001. 272 с.
15. Ивантер Э.В., Моисеева Е.А. К экологии красной полевки (*Clethrionomys rutilus*) на юго-западной периферии ареала // Тр. Карельского научного центра РАН. 2015. № 1. С. 37–47. DOI: 10.17076/eco44.
16. Капитонов В.И. Материалы к фауне млекопитающих национального парка «Нечкинский» // Научные труды национального парка «Нечкинский». 2013. Вып. 2. С. 109–112.
17. Капитонов В.И. и др. Краткий обзор фауны млекопитающих Удмуртии // Вестник Удмуртского университета. Сер. Биологическое разнообразие. 1997. Вып. 2. С. 55–69.
18. Капитонов В.И., Григорьев А.К., Безенцева С.Ю. К эколого-фаунистической характеристике млекопитающих окрестностей г. Камбарки // Вестник Удмуртского университета. 1994: спецвыпуск. С. 198–216.
19. Капитонов В.И., Загуменов М.Н. Современное распространение обыкновенного хомяка в Удмуртской Республике // Актуальные вопросы современной зоологии и экологии животных: материалы Всерос. науч. конф. Пенза, 2016. С. 45.
20. Капитонов В.И., Лыков М.В., Урусова К.А. Материалы по сезонной активности большого суслика (*Spermophilus major* Pall.) на северном пределе распространения (Удмуртская Республика) // Суслики Евразии (роды *Spermophilus*, *Spermophilopsis*): происхождение, систематика, экология, поведение, сохранение видового разнообразия. М., 2005. С. 40–42.
21. Капитонов В.И., Селиверстов Д.А., Шаранова М.Х. К оценке диагностической ценности краниометрических признаков бурозубок рода *Sorex* Удмуртии // Тез. докл. 4-й рос. университетско-академ. науч.-практ. конф. Ижевск, 1999. Ч. 2. С. 61.
22. Кирисов А.В. Звери и птицы Удмуртской Республики. Ижевск: Удм. кн. изд-во, 1969. 128 с.
23. Ковалевский Ю.В. и др. Мелкие лесные млекопитающие очагов клещевого энцефалита в Удмуртской АССР // Клещевой энцефалит в Удмуртии и прилегающих областях. Ижевск, 1969. С. 181–196.
24. Красная книга Кировской области: животные, растения, грибы / под ред. О.Г. Барановой и др. Изд. 2-е. Киров, 2014б. 336 с.
25. Красная книга Московской области / отв. ред. Т.И. Варлыгина и др. Изд. 3-е, перераб. и доп. Московская обл.: Верховье, 2018. 810 с.
26. Красная книга Нижегородской области: в 2 т. 2-е изд., перераб. и доп. Т. 1: Животные / науч. ред. Г.А. Ануфриев, С.В. Бакка, Н.Ю. Киселева. Н. Новгород: Деком, 2014в. 448 с.
27. Красная книга Республики Башкортостан: в 2 т. Т. 2: Животные. 2-е изд., доп. и перераб. Уфа: Информреклама, 2014а. 244 с.
28. Красная книга Республики Марий Эл. Т. Животные / под ред. П.В. Бедовой и др. Йошкар-Ола, 2015. 256 с.
29. Красная книга Республики Татарстан: животные, растения, грибы. Изд. 3-е. Казань: Идел-Пресс, 2016. 760 с.
30. Красная книга Российской Федерации (животные). М.: АСТ: Астрель, 2001б. 861 с.
31. Красная книга Российской Федерации. Т. Животные. 2-е изд. М., 2021. 1128 с.
32. Красная книга Удмуртской Республики. Животные / под ред. Н.Е. Зубцовского. Ижевск: Удмуртия, 2001а. 152 с.

33. Красная книга Удмуртской Республики. Изд. 2-е / отв. ред. О.Г. Баранова. Чебоксары: Перфектум, 2012. 458 с.
34. Красная книга Удмуртской Республики: животные, растения, лишайники, грибы / под ред. О.Г. Барановой, Н.И. Науменко. Изд. 3-е, доп., перераб. Белгород: КОНСТАНТА, 2023. 500 с.
35. Красная книга Чувашской Республики. Т. 1, ч. 2. Животные. Чебоксары, 2010. 372 с.
36. Лисовский А.А. и др. Млекопитающие России: список видов и прикладные аспекты // Сб. тр. Зоологического музея МГУ. 2019. Т. 56. 191 с.
37. Малькова И.Л., Рубцова И.Ю. Медико-географическая оценка природных условий Удмуртии. Ижевск: Удмуртский университет, 2016. 212 с.
38. Методические рекомендации по ведению Красной книги субъекта Российской Федерации. М., 2006. 20 с.
39. Оболенская Е.В. Особенности распространения сибирского бурундука (*Tamias sibiricus* Laxmann, 1769) // Сб. тр. Зоологического музея МГУ. 2008. Т. 49. С. 265–278.
40. Павлинов И.Я. Звери России: Справочник-определитель. Ч. 1, 2. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2019. 702 с.
41. Попов В.А., Лукин А.В. Животный мир Татарии. Казань: Татарское кн. изд-во, 1988. 248 с.
42. Пучковский С.В. *Eutamias sibiricus* / Млекопитающие России. 1996. URL: <https://rusmam.ru/data/view?id=76685>.
43. Снитко В.П., Снитко Л.В. Новые данные по распространению рукокрылых в национальном парке «Нечкинский» (Удмуртская Республика) // Вестник Удмуртского университета. Сер. Биология. Науки о Земле. 2018. Т. 28, вып. 1. С. 43–49.
44. Сотников В.Н. Аннотированный список позвоночных животных Кировской области. Киров, 2022. 60 с.
45. Учанов Д.М. К экологии обыкновенного хомяка в Удмуртской Республике // Л итог. студ. науч. конф. Удм. гос. ун-та: материалы всерос. конф. Ижевск: Удмуртский университет, 2022. С. 53–55.
46. Surov A. et al. Dramatic global decrease in the range and reproduction rate of the European hamster *Cricetus cricetus* // Endangered species research. 2016. Vol. 31. P. 119–145. DOI: 10.3354/esr00749.

References

1. Alekseev S.K., Ruchin A.B., Artaev O.N. [Notes on the fauna of small mammals (Rodentia, Insectivora) falling into soil traps]. *Trudy Mordovskogo gosudarstvennogo prirodnogo zapovednika im. P.G. Smirnoviča*. Iss. 11 (2013): pp. 234–240. (In Russ.).
2. Andreychev A.V., Kuznetsov V.A. [On the change in the list and categories of mammals in the Red Book of the Republic of Mordovia]. *Izvestija Samarskogo naučnogo centra RAN*. V. 14, No. 5 (2012): pp. 163–167. (In Russ.).
3. Aristov A.A., Baryshnikov G.F. *Mlekovitajuščie fauny Rossii i sopredel'nyh territorij. Chiščnye i lastonogie* [Mammals of the fauna of Russia and adjacent territories. Carnivores and pinnipeds]. St-Peterburg, 2001. 560 p. (In Russ.).
4. Bernshtein A.D., Apekina N.S., Kopylova L.F. [Peculiarities of Red-backed and Bank Vole Populations in the South of Udmurtia]. *Vid i ego produktivnost' v areale* [The species and its productivity in the area]. Sverdlovsk, 1984, part 1, pp. 10–11. (In Russ.).
5. Vedernikov K.E. [Spruce plantations of Udmurtia in a changing climate]. *Effektivnyj otvet na sovremennye vyzovy s učetom vzaimodejstvija čeloveka i prirody, čeloveka i tehnologij: social'no-ekonomičeskie i ekologičeskie problemy lesnogo kompleksa* [An effective response to modern challenges, taking into account the interaction of man and nature, man and technology: socio-economic and environmental problems of the forest complex: materials of the XIV International Scientific and Technical Conference]. Ekaterinburg, 2023, pp. 33–38. (In Russ.).
6. Vedernikov K.E. [The state of dark coniferous forests of the Udmurt Republic (using the green moss group as an example)]. *Meždunarodnyj naučno-issledovatel'skij žurnal*. No. 1(139) (2024): pp. 1–8. (In Russ.).
7. Georgi B.M. *Eutamias sibiricus*. Available at: <https://rusmam.ru/data/view?id=2516>. Mammals of Russia. 2007. (In Russ.).
8. Gromov I.M., Erbaeva M.A. *Mlekovitajuščie fauny Rossii i sopredel'nyh territorij. Zajceobraznye i gryzuny* [Mammals of the fauna of Russia and adjacent territories. Lagomorphs and rodents]. St-Peterburg, Nauka Publ., 1995. 641 p. (In Russ.).
9. Dedyukhin S.V., Titova V.V. [Detection of the Ussuri polygraph (*Polygraphus proximus* Blandford, 1894) (Coleoptera, Curculionidae: Scolytinae) in Udmurtia]. *Žurnal biologičeskich invazij*. №. 2 (2021): pp. 32–39. (In Russ.). DOI: 10.35885/1996-1499-2021-14-2-32-39.
10. Bayanov M.G. and Kucherov E.V., eds. *Životnyj mir Baškortostana* [Animal world of Bashkortostan]. Ufa, Kitap Publ., 1995. 312 p. (In Russ.).
11. Shurakov A.I., Voronov G.A., Kamensky Yu.N., comp. *Životnyj mir Prikam'ja* [Animal world of the Kama region]. Perm, 1989. 193 p. (In Russ.).
12. Zagumenov M.N. [Current distribution of the steppe marmot in Udmurtia 30 years after introduction]. *Vestnik Udmurtskogo universiteta. Biologija. Nauki o Zemle*. V. 25, Iss. 3 (2015): pp. 41–50. (In Russ.).

13. Zakharova A.A., Zagumenov M.N. [Small mammals of the Glazov region of Udmurtia]. *Biologičeskie nauki i bioraznoolrasie* [Biological Sciences and biodiversity: materials of the II All-Russian Scientific and Practical Conference]. Kirov, 2022, pp. 10-17. (In Russ.).
14. Ivanter E.V., Makarov A.M. *Territorial'naja èkologija zemleroeek-burozubok (Insectivora, Sorex)* [Territorial ecology of shrews (Insectivora, Sorex)]. Petrozavodsk, PetrSU Publ., 2001. 272 p. (In Russ.).
15. Ivanter E.V., Moiseeva E.A. [On the Ecology of the Red-backed Vole (*Cletrionomys rutilus*) on the Southwestern Periphery of the Range]. *Trudy Karel'skogo naučnogo centra RAN*. No. 1 (2015): pp. 37-47. (In Russ.). DOI: 10.17076/eco44.
16. Kapitonov V.I. [Materials on the fauna of mammals of the Nechkinsky National Park]. *Naučnye trudy nacional'nogo parka «Nečkinskij»*. Izhevsk, Paradigma Publ., 2013, Iss. 2, pp. 109-112. (In Russ.).
17. Kapitonov V.I. et al. [Brief overview of the mammal fauna of Udmurtia]. *Vestnik Udmurtskogo universiteta. Biologičeskoe raznoobrazie*. Iss. 2 (1997): pp. 55-69. (In Russ.).
18. Kapitonov V.I., Grigoriev A.K., Bezentseva S.Yu. [On the ecological and faunistic characteristics of mammals in the vicinity of Kambarka]. *Vestnik Udmurtskogo universiteta*, Special issue (1994): pp. 198-216. (In Russ.).
19. Kapitonov V.I., Zagumenov M.N. [Modern distribution of the common hamster in the Udmurt Republic]. *Aktual'nye voprosy sovremennoj zoologii i èkologii životnykh* [Topical issues of modern zoology and ecology of animals: materials of the All-Russian Scientific Conference]. Penza, 2016, p. 45. (In Russ.).
20. Kapitonov V.I., Lykov M.V., Urusova K.A. [Materials on seasonal activity of the large ground squirrel (*Spermophilus major* Pall.) at the northern limit of distribution (Udmurt Republic)]. *Susliki Evrazii (rody Spermophilus, Spermophilopsis): proischoždenie, sistematika, èkologija, povedenie, sochranenie vidovogo raznoobrazija* [Eurasian ground squirrels (genera *Spermophilus*, *Spermophilopsis*): origin, systematics, ecology, behavior, conservation of species diversity]. Moscow, KMK Publ., 2005, pp. 40-42. (In Russ.).
21. Kapitonov V.I., Seliverstov D.A., Sharanova M.Kh. [On the assessment of the diagnostic value of craniometric features of shrews of the genus *Sorex* in Udmurtia]. *Tezisy dokladov 4-j rossijskoj universitetsko-akademičeskoj naučno-praktičeskoj konferencii*. Izhevsk, 1999, Part 2, p. 61. (In Russ.).
22. Kirisov A.V. *Zveri i pticy Udmurtskoj Respubliki* [Animals and birds of the Udmurt Republic]. Izhevsk: Udm. Book publ. house, 1969. 128 p. (In Russ.).
23. Kovalevsky Yu.V. et al. [Small forest mammals of foci of tick-borne encephalitis in the Udmurt ASSR]. *Kleščovoj èncefalit v Udmurtii i prilëgajuščich oblastjach* [Tick-borne encephalitis in Udmurtia and surrounding areas]. Izhevsk, 1969, pp. 181-196. (In Russ.).
24. Baranova O.G. et al., eds. *Krasnaja kniga Kirovskoj oblasti* [The Red Book of the Kirov Region: animals, plants, mushrooms]. Kirov, 2014b. 336 p. (In Russ.).
25. Varlygina T.I. et al., eds. *Krasnaja kniga Moskovskoj oblasti* [The Red Book of Moscow Region]. Moscow region, Verkhovye, 2018. 810 p. (In Russ.).
26. Anufriev G.A., Bakka S.V., Kiseleva N.Yu., eds. *Krasnaja kniga Nižegorodskoj oblasti* [The Red Book of the Nizhny Novgorod Region: in 2 vol.]. V. 1: Animals. N. Novgorod, Dekom Publ., 2014v. 448 p. (In Russ.).
27. *Krasnaja kniga Respubliki Baškortostan* [The Red Book of the Republic of Bashkortostan: in 2 vol. V. 2: Animals]. Ufa, Informreklama Publ., 2014a. 244 p. (In Russ.).
28. Bedova P.V. et al., eds. *Krasnaja kniga Respubliki Mari-El* [The Red Book of the Republic of Mari El. V. Animals]. Yoshkar-Ola, 2015. 256 p. (In Russ.).
29. Nazirov A.A., ed. *Krasnaja kniga Respubliki Tatarstan* [Red Book of the Republic of Tatarstan: animals, plants, mushrooms. Ed. 3rd]. Kazan, Idel-Press Publ., 2016. 760 p. (In Russ.).
30. *Krasnaja kniga Rossiskoi Federacii (životnye)* [The Red Book of the Russian Federation (animals)]. Moscow, AST, Astrel Publ., 2001b. 861 p. (In Russ.).
31. *Krasnaja kniga Rossiskoi Federacii* [The Red Book of the Russian Federation. V. Animals]. Moscow, 2021. 1128 p. (In Russ.).
32. Zubtsovsky N.E., ed. *Krasnaja kniga Udmurtskoj Respubliki. Životnye* [Red Book of the Udmurt Republic. Animals]. Izhevsk, Udmurtia Publ., 2001a. 152 p. (In Russ.).
33. Baranova O.G., ed. *Krasnaja kniga Udmurtskoj Respubliki* [Red Book of the Udmurt Republic]. Cheboksary, Perfectum Publ., 2012. 458 p. (In Russ.).
34. Baranova O.G., Naumenko N.I., eds. *Krasnaja kniga Udmurtskoj Respubliki* [Red Book of the Udmurt Republic: animals, plants, lichens, mushrooms]. Belgorod, CONSTANTA Publ., 2023. 500 p. (In Russ.).
35. *Krasnaja kniga Čuvašskoj Respubliki* [The Red Book of the Chuvash Republic. Animals]. Cheboksary, 2010, V. 1, part 2. 372 p. (In Russ.).
36. Lisovskii A.A., Sheftel' B.I., Savel'ev A.P., Ermakov O.A., Kozlov Yu.A. et al. *Mlekopitajuščie Rossii. Spisok vidov i prikladnye aspekty* [Mammals of Russia: list of types and applied aspects]. *Sbornik trudov Zoologičeskogo muzeja MGU*. V. 56 (2019): pp. 1-191. (In Russ.).

37. Mal'kova I.L., Rubtsova I.Yu. *Mediko-geografičeskaja ocenka prirodnyh uslovij Udmurtii* [Medical and Geographical Assessment of Natural Conditions of Udmurtia]. Izhevsk, Udmurt University Publ., 2016. 212 p. (In Russ.).
38. *Metodičeskie rekomendacii po vedeniju Krasnoj knigi sub'ekta Rossijskoj Federatsii* [Methodical recommendations for maintaining the Red Book of the subject of the Russian Federation]. Moscow, 2006. 20 p. (In Russ.).
39. Obolenskaya E.V. [Features of the distribution of the Siberian chipmunk (*Tamias sibiricus* Laxmann, 1769)]. *Sbornik trudov Zoologičeskogo muzeja MGU*. V. 49 (2008): p. 265-278. (In Russ.).
40. Pavlinov I.Ya. *Zveri Rossii* [Animals of Russia: Handbook-identifier]. Part 1, 2. Moscow, KMK Publ., 2019. 702 p. (In Russ.).
41. Popov V.A., Lukin A.V. *Životnyj mir Tatarii* [Animal World of Tatarstan]. Kazan, Tatar Book Publ., 1988. 248 p.
42. Puchkovsky S.V. *Eutamias sibiricus*. Available at: <https://rusmam.ru/data/view?id=76685>. Mammals of Russia. 1996. (In Russ.).
43. Snitko V.P., Snitko L.V. [New data on the distribution of bats in the Nechkinsky National Park (Udmurt Republic)]. *Vestnik Udmurtskogo universiteta. Biologija. Nauki o Zemle*. V. 28, Iss. 1 (2018): pp. 43-49. (In Russ.).
44. Sotnikov V.N. *Annotirovannyj spisok pozvonočnyh životnyh Kirovskoj oblasti* [Annotated list of vertebrate animals of the Kirov region]. Kirov, 2022. 60 p. (In Russ.).
45. Uchanov D.M. [On the ecology of the common hamster in the Udmurt Republic]. *L itogovaja studentčeskaja konferencija* [L Final student scientific conference of Udmurt State University: proceedings of the All-Russian Conference]. Izhevsk, Udmurtskij Universitet Publ., 2022, pp. 53-55. (In Russ.).
46. Surov A. et al. Dramatic global decrease in the range and reproduction rate of the European hamster *Cricetus cricetus*. *Endangered species research*. V. 31 (2016): pp. 119-145. DOI: 10.3354/esr00749.

Статья поступила в редакцию 12.09.2024; одобрена после рецензирования 09.10.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 12.09.2024; approved after reviewing 09.10.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторах

Михаил Николаевич Загуменов – micheyzag@mail.ru, канд. биол. наук, доцент кафедры ботаники, зоологии и биоэкологии;
Владимир Иванович Капитонов – kapitonov2011@mail.ru, научный сотрудник лаборатории биоразнообразия и экологии наземных организмов;
Марина Геннадьевна Останина – brodjahzka-ja@mail.ru, зоолог отдела обеспечения эпиднадзора;
Алена Александровна Захарова – anisimova-alena-1999@yandex.ru, магистрант кафедры ботаники, зоологии и биоэкологии;
Карина Арсеньевна Тимирязнова – ktimirzyanova@gmail.com, магистрант кафедры ботаники, зоологии и биоэкологии.

Information about the authors

Mikhail N. Zagumenov – micheyzag@mail.ru, PhD in Biology, associate professor of the Department of Botany, Zoology and Bioecology;
Vladimir I. Kapitonov – kapitonov2011@mail.ru, research fellow of the Laboratory of Biodiversity and Ecology of Terrestrial Organisms;
Marina G. Ostanina – brodjahzka-ja@mail.ru, zoologist of the Department of Epidemiological Surveillance;
Alena A. Zakharova – anisimova-alena-1999@yandex.ru, master student of the Department of Botany, Zoology and Bioecology;
Karina A. Timirzyanova – ktimirzyanova@gmail.com, master student of the Department of Botany, Zoology and Bioecology.

Вклад авторов:

Загуменов М.Н. – написание текста; сбор полевого материала; определение мелких млекопитающих.
Капитонов В.И. – написание текста; сбор полевого материала; определение мелких млекопитающих.
Останина М.Г. – сбор полевого материала по красной полевке.
Захарова А.А. – сбор полевого материала.
Тимирязнова К.А. – сбор полевого материала.

Contribution of the authors:

Zagumenov M.N. – writing the text; collecting field data; identifying small mammals.
Kapitonov V.I. – writing the text; collecting field data; identifying small mammals.
Ostanina M.G. – collecting field data on the red-backed vole.
Zakharova A.A. – collecting field data.
Timirzyanova K.A. – collecting field data.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.86

EDN MXMDPF

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-390-400



Влияние тяжелых металлов на штаммы рода *Enterococcus*

Светлана Сергеевна Ускова^{1✉}, Алина Викторовна Мартынова^{2, 3}

^{1, 2} Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

^{1✉} Uskova.SS@yandex.ru

³ Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России, Владивосток, Россия, clinmicro@yandex.ru

Аннотация. Изучалось влияние тяжелых металлов на микробиологические свойства штаммов рода *Enterococcus*, выделенных из водной среды. Было исследовано 18 образцов воды из устья р. Вторая Речка, из которых выделено 30 штаммов бактерий рода *Enterococcus*. Идентификация проводилась методом полимеразной цепной реакции. Изучалась морфология клеток с помощью световой микроскопии; устойчивость к тяжелым металлам определялась по наличию или отсутствию роста на чашке с разными концентрациями металлов (меди, кадмия, цинка). Выявлено, что при увеличении концентрации тяжелых металлов у бактерий рода *Enterococcus* изменяются морфологические характеристики, а превышение ПДК приводит к гибели бактерии. По степени действия изученных металлов их можно расположить в следующей последовательности: Cd > Cu > Zn.

Ключевые слова: род *Enterococcus*, тяжелые металлы, медь, кадмий, цинк

Для цитирования: Ускова С. С., Мартынова А. В. Влияние тяжелых металлов на штаммы рода *Enterococcus* // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 390–400. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-390-400>.

Благодарности: авторы выражают благодарность А. В. Ким за помощь в проведении исследования.

MICROBIOLOGY

Original article

The effect of heavy metals on strains of the genus *Enterococcus*

Svetlana S. Uskova^{1✉}, Alina V. Martynova^{2, 3}

^{1, 2} Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

^{1✉} Uskova.SS@yandex.ru

³ Pacific State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Vladivostok, Russia, clinmicro@yandex.ru

Abstract. Heavy metals are widespread pollutants of natural water, where they end up because of almost constant use in agriculture and due to the discharge of industrial wastewater: primarily lead, cadmium and copper. On the other hand, heavy metals such as copper and zinc are known to be cofactors in many cellular processes and are required for cell survival in small concentrations. At the same time, such a heavy metal as cadmium does not function as a cofactor in the bacterial cell and has a toxic nature, disrupting cellular processes and causing cell death if the concentration exceeds a certain threshold. Thus, the sensitivity of enterococci to heavy metals is a property that characterizes the dynamics of anthropogenic load on the microbiocenosis of both freshwater and marine aquatic ecosystems. The aim of this investigation is to study the effect of heavy metals on strains of the genus *Enterococcus* isolated from the aquatic environment. Materials and methods: 18 water samples from the Second River mouth were studied, 30 strains of bacteria of the genus *Enterococcus* were isolated. Identification was carried out using the polymerase chain reaction method. Cell morphology was studied using light microscopy, and resistance to heavy metals was determined by the presence or absence of growth on a plate with different concentrations of metals (copper, cadmium, zinc). The results of the study showed that with an increase in the concentration of heavy metals in bacteria of the genus *Enterococcus*, the morphological characteristics change, and exceeding the MPC (maximum permissible concentration) leads to the death of the bacterium. According to the rate of action of the studied metals, they can be arranged in the following sequence: Cd > Cu > Zn.

Keywords: genus *Enterococcus*, heavy metals, copper, cadmium, zinc

For citation: Uskova S. S., Martynova A. V. [The effect of heavy metals on strains of the genus *Enterococcus*]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 4 (2024): pp. 390-400. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-390-400>.

Acknowledgments: the authors express gratitude to A. V. Kim for assistance in conducting the study.

Введение

Тяжелые металлы являются естественными компонентами морской и пресноводной среды и обычно встречаются в очень низких концентрациях [Shah, 2021]. Природные процессы, способствующие распространению этих металлов в окружающей среде, включают эрозию, извержения вулканов и выветривание полезных ископаемых, при этом они обычно находятся в нерастворимых формах [Ayangbenro, Babalola, 2017].

Антропогенная деятельность, такая как дренаж шахт, морская разведка нефти и газа, промышленные (пестициды, краски, кожа, текстиль, удобрения, фармацевтические препараты) и бытовые сточные воды, сельскохозяйственные стоки, сбросы кислотных дождей, а также прибрежное строительство и дноуглубительные работы, неизбежно увеличили концентрации металлов в морской среде [Fu, Wang, 2011]. Тяжелые металлы из антропогенных источников обычно имеют высокую биодоступность благодаря своим растворимым и подвижным реакционноспособным формам [Ayangbenro, Babalola, 2017].

Энтерококки – это представители нормальной микрофлоры кишечника человека и животных, но также они могут выделяться из носоглотки, верхних дыхательных путей, мочеполовой системы и кожных покровов [Barbosa, Borges, Teixeira, 2014]. Ранее считалось, что микроорганизмы рода *Enterococcus* являются эпидемиологически малозначимыми, т.к. достаточно редко регистрировались микробиологически подтвержденные клинические случаи энтерококковых инфекций. Однако данная точка зрения была пересмотрена, поскольку у бактерий данной группы были обнаружены факторы вирулентности и оценена их активность [Красная, Нестеров, Потатуркина-Нестерова, 2014]. Патогенность представителей рода *Enterococcus* обусловлена их чувствительностью к антибиотикам и наличием детерминант патогенности в генетической информации. Наиболее распространенными видами в этой группе являются *E. faecalis* и *E. faecium*, причем *E. faecalis* встречается чаще. Соотношение этих микроорганизмов в водной среде зависит от экологических условий. В микробиоценозе могут присутствовать и другие виды рода *Enterococcus*. *E. faecalis* – более патогенен, чем *E. faecium*, однако последний обладает большей устойчивостью к антибиотикам [Butaye, Devriese, Haesebrouck, 2001]. Такие представители энтерококков, как *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus gallinarum* и *Enterococcus casseliflavus*, проявляют патогенные свойства лишь в единичных случаях [Sadowy, Luczkiewicz, 2014].

Несмотря на то, что энтерококки могут выживать как в пресной, так и в морской воде, до сих пор нет единого мнения относительно их способности расти и размножаться в этих средах из-за нехватки питательных веществ [Cesare et al., 2014]. Несмотря на это, энтерококки могут быть выделены из множества условий окружающей среды с различной доступностью питательных веществ, таких как почва, пресная вода, пляжи и очистные сооружения [Красная, Нестеров, Потатуркина-Нестерова, 2014]. Сточные воды, не прошедшие должную очистку, могут стать источником загрязнения как поверхностных, так и подземных вод, что представляет собой серьезную угрозу для окружающей среды. Это может произойти вследствие неэффективности систем очистки сточных вод, а также из-за неполадок или перегруженности систем водоотведения. Кроме того, сточные воды могут содержать отходы животноводства, которые, попадая на сушу или в водоемы, создают угрозу для людей, которые могут случайно употребить загрязненную воду или вступить с ней в контакт в повседневной жизни [Burgmann et. al., 2018].

В более новых исследованиях, в особенности с применением молекулярно-генетических методов, была подтверждена способность микроорганизмов рода *Enterococcus* приобретать устойчивость к антибактериальным химиопрепаратам, а также к высушиванию, температуре и действию других физических, химических и биологических факторов [Gin, Goh, 2013]. Данная особенность позволяет им выживать в желудочно-кишечном тракте и колонизировать толстый кишечник, также их выделяют с кожи, ротовой полости и женского мочеполового тракта [Barbosa, Borges, Teixeira, 2014]. Попадая в окружающую среду, они могут некоторое время сохраняться в жизнеспособном, но некультивируемом состоянии [Gin, Goh, 2013], а в некоторых местах, например таких, как морская вода, они могут обмениваться генами устойчивости к антибиотикам и металлам с другими бактериями [Cesare et al, 2014].

Тяжелые металлы, такие как медь и цинк, являются кофакторами многих клеточных процессов и необходимы для выживания клеток, но они нужны в небольших концентрациях [Arguello, Raimunda, Padilla-Benavides, 2013]. Однако такой тяжелый металл, как кадмий, не выполняет функции кофактора в бактериальной клетке и по своей природе токсичен, нарушая клеточные процессы и вызывая гибель клеток, если концентрация выше определенного порога [Arguello, Raimunda, Padilla-Benavides, 2013; Parsons, Lee, Kathariou, 2020].

Медь является важным микроэлементом в клетках и выполняет несколько биологических функций. Она служит значимым структурным компонентом и каталитическим кофактором для широкого спектра различных ферментов в важных биохимических путях у бактерий, растений и животных [Zhang et al., 2015]. Сульфат меди используется в кормах для свиней и кур в качестве стимулятора роста. [Garrido, Galvez, Pulido, 2014]. Ген *tcrB*, расположенный в плазмиде, отвечает за устойчивость к меди. Ген *trcB* (обнаруженный в опероне *tcrYAZB*, гомологичный оперону *copYAZAB*, определяющий гомеостаз меди)

кодирует предполагаемый белок, принадлежащий к семейству АТФаз СРх-типа переносчиков тяжелых металлов. Бактерии, несущие плазмидный оперон *tcrYAZB*, могут переносить до 28 мМ сульфата меди, в то время как те, у которых отсутствует этот ген, могут переносить только до 8 мМ [Hasman, Aarestrup, 2002]. Ген *tcrB* генетически связан с генами, кодирующими устойчивость к макролидам (*erm B*) и гликопептидам (*vanA*) в плазидах, из энтерококков, выделенных от свиней [Garrido, Galvez, Pulido, 2014].

Цинк является компонентом многих белков, таких как ДНК-полимеразы, протеазы и рибосомальные белки, а также кофактором многих ферментативных реакций. Несмотря на важность цинка, его избыток может быть вредным, поскольку он может конкурировать с другими металлами за связывание с активными центрами ферментов [Somerville, Proctor, 2009]. Два гена *E. faecalis*, кодирующие АТФазу Р-типа, EF1400 и белок SapB EF0759, значимо активируются в присутствии высоких концентраций цинка. Zn^{2+} -чувствительный ДНК-связывающий мотив присутствует в промоторных областях этих генов [Abrantes, Kok, Lopes, 2014].

Кадмий. В настоящее время считается, что кадмий не является кофактором биохимических процессов в клетке и по своей природе токсичен, нарушая клеточные процессы и вызывая гибель клеток выше определенного порога. Хотя этот металл может естественным образом присутствовать в окружающей среде или в результате антропогенного загрязнения, его распределение в окружающей среде имеет тенденцию быть неоднородным, и обычно он встречается в больших количествах только в определенных экосистемах [Parsons, Lee, Kathariou, 2020]. Кадмий оказывает чрезвычайно токсичное действие на микроорганизмы при относительно низких дозах [Abou-Shanab, Berkum, Angle, 2007]. Кадмий может связываться с сульфгидрильными группами и, как следствие, – нарушать функцию белка [Jungmann et al., 1993]. Кроме того, кадмий является репрессором тиоредоксина, который обеспечивает восстанавливающую способность для многих биологических реакций [Li, Krumholz, 2007]. Помимо этого, кадмий влияет на пролиферацию, дифференцировку, апоптоз клеток и увеличивает активацию онкогенов для канцерогенеза [Schwartz, Reis, 2000]. Несмотря на все вышеперечисленное, штаммы *E. faecalis* проявляют высокую естественную устойчивость к кадмию [Paplase, Boutibonnes, Auffray, 1996]. В процессе защиты *E. faecalis* от кадмия участвуют такие гены, как *cadA*, *ppx* и *dsbA*. Механизм абсорбции и устойчивости к кадмию начинается с системы поглощения магния, цинка и кальция [Wu et al., 2014]. Затем кадмий частично транспортируется через АТФазы Р-типа [Tsai, Yoon, Lynn, 1992], осаждаемый фосфатными группами, которые секретировались РрХ в виде фосфида кадмия. Затем белок DsbA связывается со свободным ионом кадмия в цитозоле для защиты тиоредоксина и других белков [Wu et al., 2014].

Несмотря на то, что тяжелые металлы могут естественным образом присутствовать в окружающей среде в результате антропогенного загрязнения, их распределение в окружающей среде бывает неоднородным, и они обычно встречаются в больших количествах только в определенных экосистемах. Тем не менее, детерминанты устойчивости к токсичным металлам широко распространены у грамположительных бактерий и содержатся либо в хромосомах, либо на мобильных генетических элементах, таких как транспозоны и плазмиды, включая интегративные и конъюгативные элементы. Эти детерминанты могут распространяться посредством горизонтального переноса генов и, таким образом, могут быть широко распространены и высококонсервативны [Parsons, Lee, Kathariou, 2020]. Деятельность человека, способствующая такому распространению, и является однозначным фактором, модифицирующим микробиоценоз морских и пресноводных экосистем, что требует включать мониторинг за чувствительностью энтерококков к тяжелым металлам в рутинные схемы микробиологического мониторинга хотя бы на периодической основе. Цель работы – изучить влияние тяжелых металлов, выделенных из водной среды, на микробиологические свойства штаммов рода *Enterococcus*.

Материалы и методы исследований

Для исследования чувствительности штаммов рода *Enterococcus* к тяжелым металлам изучено 18 образцов воды из устья р. Вторая Речка (43.160456, 131.905963), т.к. река находится в черте города и подвержена загрязнению тяжелыми металлами [Шулькин, Богданова, Киселев, 2007]. Выделено 30 штаммов бактерий рода *Enterococcus*, идентификация проводилась методом полимеразной цепной реакции. Штаммы идентифицировали с помощью ПЦР с использованием известных праймеров гена 16S рРНК 5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3' 5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'. Размер 440 п.о. [Skowron et al., 2016]. Синтез праймеров осуществлен компанией «Синтол» (Москва, Россия).

Морфологию бактериальных клеток оценивали методом окраски по Граму. Исследование производилось с помощью микроскопа марки Primo Start, производитель Zeiss. Отмечали окраску мазка, а также размер, форму, способ расположения бактерий на предметном стекле [Прунтова, 2005].

Изучение устойчивости к металлам. Устойчивость к металлам изучали на среде для морских микроорганизмов (СММ) (г/л: $CaCO_3$ – 1.0; $MgSO_4$ – 1.0; пептон – 5.0; дрожжевой экстракт – 5.0; K_2HPO_4 –

0.2; глюкоза – 0.2; агар – 15.0; дистиллированная вода – 1 000; pH 7.8–8.1) с добавлением в качестве селективной добавки соли металлов (CuSO_4 , ZnSO_4 , CdSO_4) в возрастающих концентрациях. Автоклавировали при 121°C в течение 15 мин. Суточную культуру бактерий с помощью микробиологической петли засеивали на чашки Петри с питательной средой СММ. Посев проводился в трех повторениях. Культуру выращивали при комнатной температуре в течение 2–3 суток. Учет результатов проводился по наличию или отсутствию роста на чашках с металлами [Бузолева, 2011].

Статистическая обработка данных производилась в программе STATISTICA 10. Графики и таблицы формировались в программе Excel.

Результаты и их обсуждение

При исследовании чувствительности бактерий рода *Enterococcus*, выделенных в р. Вторая Речка, выявлено, что все выделенные штаммы резистентны к тяжелым металлам (CuSO_4 , ZnSO_4 и CdSO_4). Они росли при концентрациях, которые превышали предельно допустимые концентрации (ПДК) [Шулькин, Богданова, Киселев, 2007].

ПДК для меди в морской воде составляет 0.05 мг/л, а в пресной – 0.01 мг/л [Коршенко, 2020], однако 17% (5) штаммов рода *Enterococcus*, выделенные в бухте р. Вторая Речка, росли при 1 500 мг/л (рис. 1). При концентрации 1 450 мг/л происходит резкое снижение роста у 57% (17) штаммов рода *Enterococcus*, поэтому данные штаммы можно считать чувствительными, а 43% (13) продолжают расти, оставаясь при этом устойчивыми.

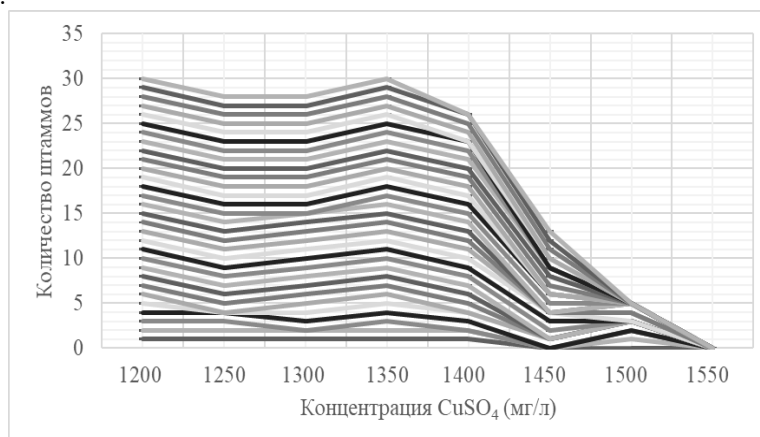


Рис. 1. Влияние различных концентраций меди на культивирование бактерии рода *Enterococcus* [The effect of different copper concentrations on the cultivation of bacteria of the genus *Enterococcus*]

Отмечено изменение культуральных свойств: с увеличением концентрации CuSO_4 до 1 400 мг/л стали появляться непрозрачные колонии оранжевого цвета и с металлическим блеском, а другие колонии, наоборот, стали прозрачными. Также отмечено изменение морфологии бактерий рода *Enterococcus*: при концентрации 800 мг/л бактериальные клетки располагались парами; при концентрации 1 400 мг/л – бактериальные клетки располагались парами и наблюдалось незначительное увеличение размера клеток; при 1 500 мг/л клетки располагались парами и короткими цепочками и стали более круглыми по сравнению с более низкими концентрациями (рис. 2). Медь может оказывать токсическое воздействие на бактериальные клетки, что связано с ее влиянием на стабильность белков. Медь может как увеличивать, так и уменьшать стабильность белков, особенно тех, которые участвуют в работе рибосом, синтезе белка и регулировании окислительно-восстановительных процессов в клетке [Wiebelhaus et al., 2021].

ПДК для цинка в морской среде составляет 0.05 мг/л, а для пресных вод – 0.01 мг/л [Коршенко, 2020]. Однако изученные штаммы росли и при более высоких концентрациях (рис. 3), демонстрируя при этом различия в морфологии культуры. Также нами было выявлено, что 60% штаммов (18) росли при концентрации 2 150 мг/л и были определены нами как устойчивые, а 40% (12) прекращали рост и являлись чувствительными. При концентрации цинка, равной 800 мг/л, бактериальные клетки располагались парами; при концентрации 1 800 мг/л бактериальные клетки располагались парами, короткими и длинными цепочками и наблюдались плеоморфные клетки (мелкие кокки и крупные палочки); при концентрации 2 100 мг/л бактериальные клетки располагались парами, короткими и длинными цепочками (рис. 4).

Согласно литературным источникам, цинк, подобно меди, способен оказывать токсическое воздействие на бактерии. Это объясняется его влиянием на стабильность белков, которые играют ключевую роль в жизнедеятельности бактериальных клеток. Цинк может влиять на работу рибосом, которые отвечают за синтез белка в бактериальной клетке. Это может привести к нарушению синтеза необходимых белков и, как следствие, к снижению жизнеспособности энтерококков. Цинк играет важную роль в регу-

ляции окислительно-восстановительных процессов в бактериальной клетке. Нарушение этих процессов может привести к снижению жизнеспособности энтерококков. Цинк может как увеличивать, так и уменьшать стабильность белков в бактериальной клетке. Это может привести к нарушению работы белков, которые необходимы для жизнедеятельности энтерококков [Frei et al., 2023].

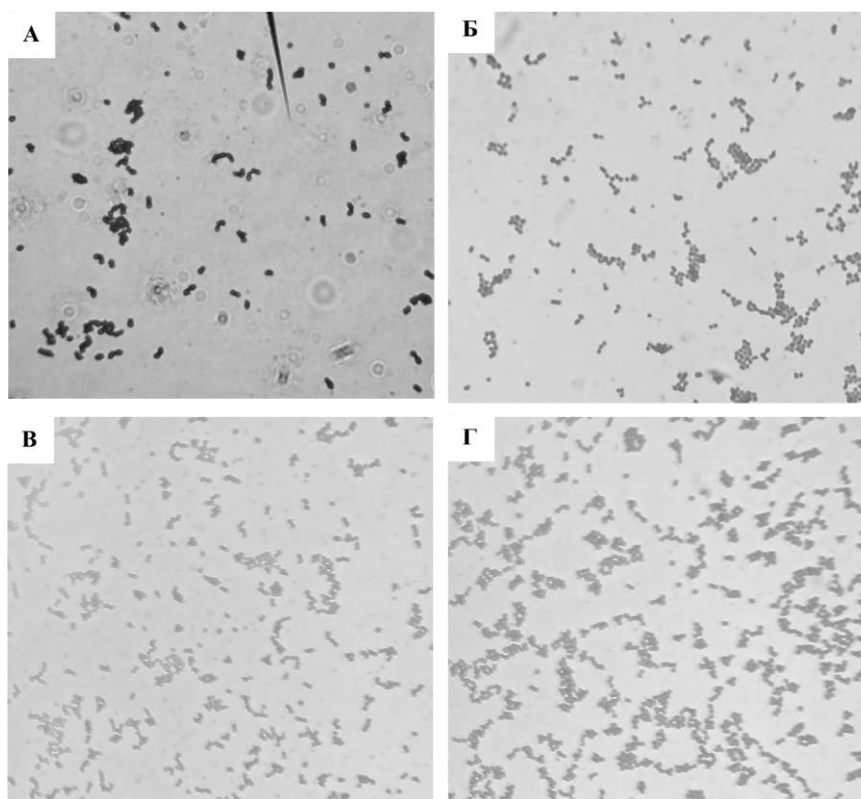


Рис. 2. Влияние различных концентраций меди на морфологию бактерий рода *Enterococcus* (микроскоп Primo Start, 100×).

Концентрация CuSO_4 : а – контроль (среда СММ без добавления солей металлов), б – 800 мг/л, в – 1 400 мг/л, г – 1 500 мг/л

[Effect of different copper concentrations on the morphology of bacteria of the genus *Enterococcus* (Primo Start microscope, 100×).

CuSO_4 concentration: a – control (SMM medium without the addition of metal salts), b – 800 mg/l, c – 1400 mg/l, d – 1500 mg/l]

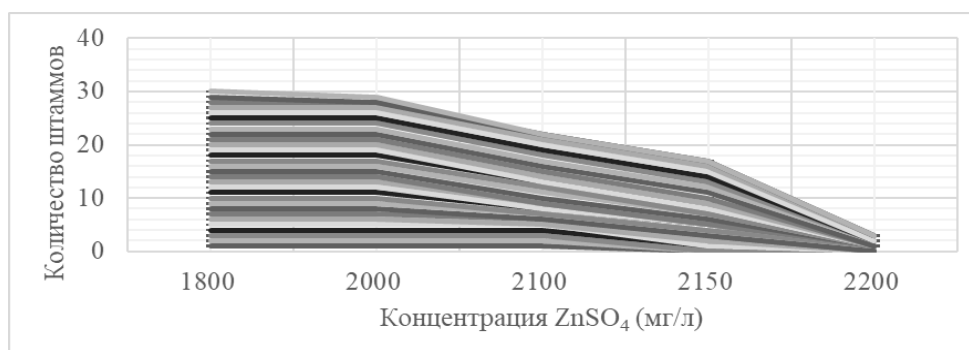


Рис. 3. Влияние различных концентраций цинка на культивирование бактерии рода *Enterococcus* [The effect of different zinc concentrations on the cultivation of bacteria of the genus *Enterococcus*]

ПДК для кадмия в морской воде составляет 0.01 мг/л, а для пресных вод – 0.005 мг/л [Коршенко, 2020]. Однако изученные штаммы росли и при более высоких концентрациях (рис. 5): выявлено, что 37% (11) штаммов растут при концентрации 750 мг/л, следовательно, данные штаммы можно считать устойчивыми, а 63% (19) – чувствительными. При концентрации кадмия 250 мг/л наблюдалось расположение клеток короткими цепочками; при концентрации 500 мг/л наблюдались короткие цепочки и небольшое

количество плеоморфных клеток (разных форм и размеров); при концентрации 750 мг/л – наблюдались короткие цепочки и плеоморфные клетки (разных форм и размеров) (рис. 6).

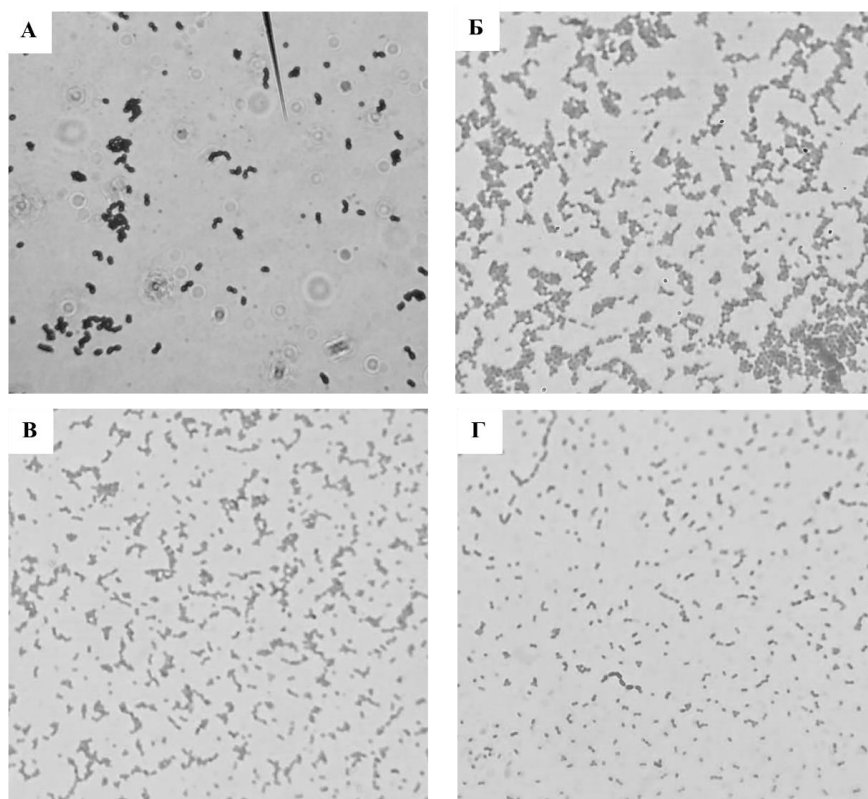


Рис. 4. Влияние различных концентраций цинка на морфологию бактерий рода *Enterococcus* (микроскоп Primo Start, 100×).

Концентрация $ZnSO_4$: а – контроль (среда СММ без добавления солей металлов), б – 800 мг/л, в – 1 800 мг/л, г – 2 200 мг/л

[Effect of different concentrations of zinc on the morphology of bacteria of the genus *Enterococcus* (Primo Start microscope, 100×).

Concentration of $ZnSO_4$: а – control (SMM medium without the addition of metal salts), б – 800 mg/l, в – 1800 mg/l, г – 2200 mg/l]

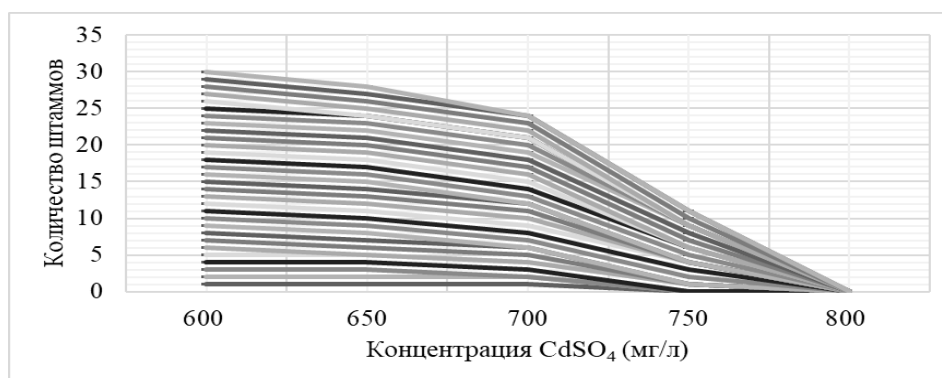


Рис. 5. Влияние различных концентраций кадмия на культивирование бактерии рода *Enterococcus* [The effect of different cadmium concentrations on the cultivation of bacteria of the genus *Enterococcus*]

В соответствии с данными, представленными в научной литературе, кадмий, как и другие тяжелые металлы, может оказывать токсическое воздействие на клетки бактерии. Это связано с его способностью накапливаться в клетках и нарушать их метаболические процессы. Проникая в клетки энтерококков, кадмий способен нарушать целостность их мембран, что приводит к гибели бактерий. Этот процесс обусловлен тем, что кадмий оказывает влияние на работу рибосом, отвечающих за синтез белка в бактериальной клетке. В результате может произойти нарушение синтеза необходимых белков, что негативно

сказывается на жизнеспособности энтерококков. Кроме того, кадмий может нарушать работу ферментов, участвующих в окислительно-восстановительных процессах в бактериальной клетке. Накопление кадмия в клетках энтерококков приводит к нарушению метаболических процессов, что негативно сказывается на жизнеспособности бактерий [Li, Krumholz, 2007; Wu et al., 2014]. Однако стоит отметить, что конкретные механизмы воздействия меди, цинка и кадмия на энтерококки требуют дальнейшего изучения. Также необходимо учитывать, что устойчивость энтерококков к цинку может зависеть от многих факторов, таких как концентрация цинка, время воздействия и другие условия эксперимента.

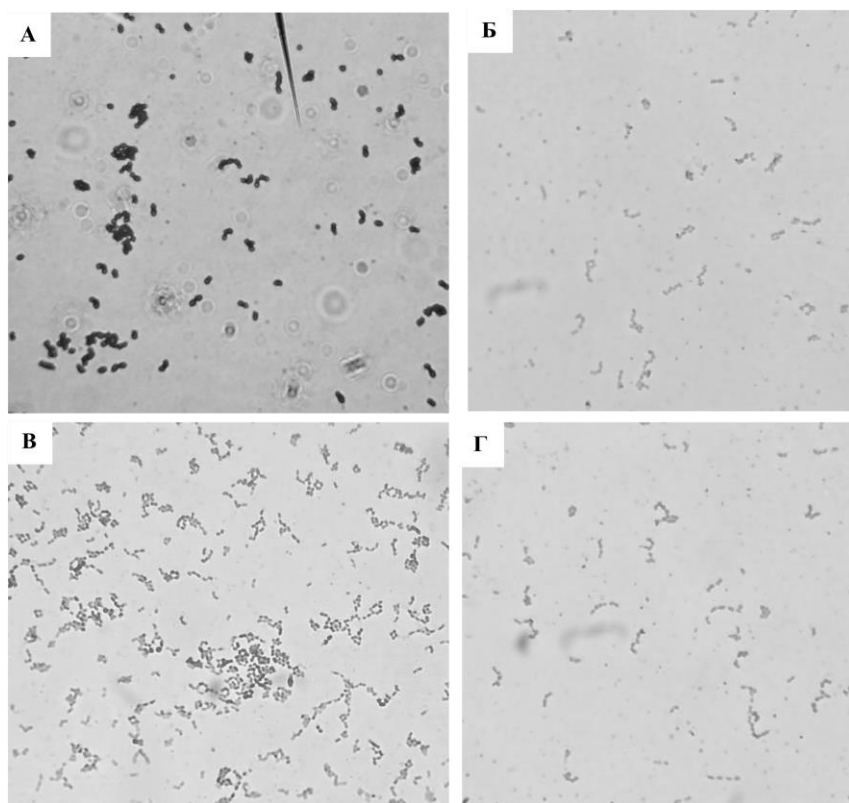


Рис. 6. Влияние различных концентраций кадмия на морфологию бактерий рода *Enterococcus* (микроскоп Primo Start, 100×).

Концентрация CdSO_4 : а – контроль (среда СММ без добавления солей металлов), б – 250 мг/л, в – 500 мг/л, г – 750 мг/л

[Effect of different cadmium concentrations on the morphology of bacteria of the genus *Enterococcus* (Primo Start microscope, 100×).

Concentration of CdSO_4 : a – control (SMM medium without the addition of metal salts), b – 250 mg/l, c – 500 mg/l, d – 750 mg]

Проблема устойчивости патогенных микроорганизмов к антибиотикам приобретает глобальный характер. С одной стороны, бактерии становятся все более устойчивыми к существующим препаратам, а с другой – разработка новых антибиотиков замедляется. В связи с этим возникает необходимость поиска альтернативных методов борьбы с инфекциями. Тяжелые металлы, такие как медь, цинк, железо и марганец, играют важную роль в клеточных процессах бактерий. Около 30–40% известных белков содержат металлический кофактор, который критически важен для их структуры или функции [Frei et al., 2023]. Однако эти же металлы становятся токсичными в высоких концентрациях, и бактерии стараются ограничить их поглощение. Тяжелые металлы, будучи токсичными, могут влиять на рост, морфологию и биохимическую активность бактерий, что может привести к изменениям биомассы, а также разнообразия и структуры сообщества [Zhao et al., 2019]. Таким образом, для защиты микробной клетки бактерии регулируют концентрацию тяжелых металлов, используя различные защитные механизмы, ферментативное преобразование в менее токсичные формы, снижение поглощения тяжелых металлов, или другие варианты, которые позволяют бактериям сопротивляться или переносить стресс, вызванный тяжелыми металлами [Gupta et al., 2023].

Заключение

Выяснено, что штаммы бактерий рода *Enterococcus* способны расти при концентрациях, в тысячи раз превышающие ПДК тяжелых металлов в морской и пресной воде. При увеличении концентрации тяжелых металлов у бактерий рода *Enterococcus* изменяются морфологические характеристики, а превышение минимальной ингибирующей концентрации приводит к гибели бактерии. По степени действия изученных металлов их можно расположить в следующей последовательности: Cd > Cu > Zn, 800 мг/л, 1 550 мг/л и 2 200 мг/л соответственно. Особенно это важно в связи тем, что устойчивость к тяжелым металлам является селективным фактором для штаммов энтерококков и способствует появлению генетических линий микроорганизмов, выделенных из водных объектов окружающей среды, обладающих измененными свойствами, такими как устойчивость к антимикробным химиопрепаратам.

Список источников

1. Бузолева Л.С. Микробиологическая оценка качества природных вод. Владивосток, 2011. 85 с.
2. Коршенко А.Н. Качество морских вод по гидрохимическим показателям. Ежегодник 2019. М.: Наука, 2020. 281 с.
3. Красная Ю.В., Нестеров А.С., Потатуркина-Нестерова Н.И. Значение бактерий рода *Enterococcus* в жизнедеятельности человека // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 3. С. 1169–1178.
4. Прунтова О.В. Лабораторный практикум по общей микробиологии. М.: Владимир, 2005. 77 с.
5. Шулькин В.М., Богданова Н.Н., Киселев В.И. Металлы в речных водах Приморского края // Геохимия. 2007. Т. 1. С. 79–88.
6. Abou-Shanab R., Berkum V.P., Angle J. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale* // Chemosphere. 2007. Vol. 68. P. 360–367. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.12.051.
7. Abrantes M.C., Kok J., Lopes M.de F.S. *Enterococcus faecalis* zinc-responsive proteins mediate bacterial defence against zinc overload, lysozyme and oxidative stress // Microbiology. 2014. Vol. 160. P. 2755–2762. DOI: 10.1099/mic.0.080341-0.
8. Arguello J.M., Raimunda D., Padilla-Benavides T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2013. Vol. 3, № 73. P. 1–14. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00073.
9. Ayangbenro A.S., Babalola O.O. A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents // Int. J. Environ. Res. Public. Health. 2017. Vol. 14, № 94. P. 1–16. DOI: 10.3390/ijerph14010094.
10. Barbosa J., Borges S., Teixeira P. Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food // International Journal of Food Microbiology. 2014. Vol. 191. P. 144–148. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.009.
11. Burgmann H. et al. Water, and sanitation: an essential battlefield in the war on antimicrobial resistance // FEMS Microbiol. Ecol. 2018. Vol. 94. P. 1–14. DOI: 10.1093/femsec/fiy101.
12. Butaye P., Devriese L.A., Haesebrouck F. Differences in Antibiotic Resistance Patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Farm and Pet Animals // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001. Vol. 45, № 5. P. 1374–1378. DOI: 10.1128/AAC.45.5.1374-1378.2001.
13. Cesare Di A. et al. The marine environment as a reservoir of enterococci carrying resistance and virulence genes strongly associated with clinical strains // Environmental Microbiology Reports. 2014. Vol. 6, № 2. P. 184–190. DOI: 10.1111/1758-2229.12125.
14. Frei A. et al. Metals to combat antimicrobial resistance // Nature Reviews Chemistry. 2023. Vol. 7. P. 202–224. DOI: 10.1038/s41570-023-00463-4.
15. Fu F., Wang Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review // J. Environ. Manage. 2011. Vol. 92. P. 407–418. DOI: 10.1016/j.jenvman.2010.11.011.
16. Garrido A.M., Galvez A., Pulido R.P. Antimicrobial Resistance in Enterococci // J. Infect. Dis. Ther. 2014. Vol. 2, № 4. P. 1–7. DOI: 10.4172/2332-0877.1000150.
17. Gin K.Y.H., Goh S.G. Modeling the effect of light and salinity on viable but non-culturable (VBNC) *Enterococcus* // Water Research. 2013. Vol. 47, № 10. P. 3315–3328. DOI: 10.1016/j.watres.2013.03.021.
18. Gupta S. et al. Ahammad Heavy metal and antibiotic resistance in four Indian and UK rivers with different levels and types of water pollution // Science of The Total Environment. 2023. Vol. 857, № 1. Art. 159059. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.159059.
19. Hasman H., Aarestrup F.M. tcrB, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance // Antimicrob Agents Chemother. 2002. Vol. 46. P. 1410–1416. DOI: 10.1128/aac.46.5.1410-1416.2002.
20. Jungmann J. et al. Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis // Nature. 1993. Vol. 361. P. 369–371.

21. Li X., Krumholz L.R. Regulation of arsenate resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* G20 by an *arsRBCC* operon and an *arsC* gene // *J. Bacteriol.* 2007. Vol. 189. P. 3705–3711. DOI: 10.1128/jb.01913-06.
22. Paplace J.M., Boutibonnes P., Auffray Y. Unusual resistance and acquired tolerance to cadmium chloride in *Enterococcus faecalis* // *J. Basic. Microbiol.* 1996. Vol. 36. P. 311–317. DOI: 10.1002/jobm.3620360504.
23. Parsons C., Lee S., Kathariou S. Dissemination and conservation of cadmium and arsenic resistance determinants in *Listeria* and other Gram-positive bacteria // *Molecular Microbiology.* 2020. Vol. 113. P. 560–569. DOI: 10.1111/mmi.14470.
24. Sadowy E., Luczkiewicz A. Drug-resistant and hospital-associated *Enterococcus faecium* from wastewater, riverine estuary and anthropogenically impacted marine catchment basin // *BMC Microbiology.* 2014. Vol. 14, № 66. P. 1–15. DOI: 10.1186/1471-2180-14-66.
25. Schwartz G.G., Reis I.M. Is cadmium a cause of human pancreatic cancer // *Cancer. Epidemiol. Biomark. Prev.* 2000. Vol. 9. P. 139–145.
26. Shah S.B. Heavy Metals in the Marine Environment—An Overview // *Heavy Metals in Scleractinian Corals / Springer Briefs in Earth Sciences.* Springer, Cham. 2021. P. 1–26. DOI: 10.1007/978-3-030-73613-2_1.
27. Skowron K. et al. Prevalence and distribution of VRE (vancomycin resistant enterococci) and VSE (vancomycin susceptible enterococci) strains in the breeding environment // *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* 2016. Vol. 23, № 2. P. 231–236. DOI: 10.5604/12321966.1203882.
28. Somerville G.A., Proctor R.A. At the crossroads of bacteria metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2009. Vol. 73. P. 233–248. DOI: 10.1128/mmbr.00005-09.
29. Tsai K., Yoon K., Lynn A. ATP-dependent cadmium transport by the *cadA* cadmium resistance determinant in everted membrane vesicles of *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 1992. Vol. 174. P. 116–121. DOI: 10.1128/jb.174.1.116-121.1992.
30. Wiebelhaus N. et al. Protein folding stability changes across the proteome reveal targets of Cu toxicity in *E. coli* // *ACS Chem. Biol.* 2021. Vol. 16. P. 214–224. DOI: 10.1021/acscchembio.0c00900.
31. Wu G. et al. *Enterococcus faecalis* strain LZ-11 isolated from Lanzhou reach of the Yellow River is able to resist and absorb Cadmium // *Journal of Applied Microbiology.* 2014. Vol. 116. P. 1172–1180. DOI: 10.1111/jam.12460.
32. Zhang S. et al. Genome sequences of copper resistant and sensitive *Enterococcus faecalis* strains isolated from copper-fed pigs in Denmark // *Standards in Genomic Sciences.* 2015. Vol. 35. P. 1–10.
33. Zhao X. et al. Study on the influence of soil microbial community on the long-term heavy metal pollution of different land use types and depth layers in mine // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2019. Vol. 170. P. 218–226. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.11.136.

References

1. Buzoleva L.S. *Mikrobiologičeskaja ocenka kačestva prirodnyh vod* [Microbiological assessment of the quality of natural waters]. Vladivostok, 2011. 85 p. (In Russ.).
2. Korshenko A.N. *Kačestvo morskich vod po gidrochimičeskim pokazateljam. Ežegodnik 2019* [Quality of sea waters according to hydrochemical indicators. Yearbook 2019]. Moscow, Nauka Publ., 2020. 281 p. (In Russ.).
3. Krasnaya Yu.V., Nesterov A.S., Potaturkina-Nesterova N.I. [The significance of the destruction of the *Enterococcus* genus in human life]. *Sovremennye problem nauki i obrazovanija.* No. 3 (2014): pp. 1169–1178. (In Russ.).
4. Pruntova O.V. *Laboratornyj praktikum po obščej mikrobiologii* [Laboratory workshop on general microbiology]. Moscow, Vladimir Publ., 2005. 77 p. (In Russ.).
5. Shulkin V.M., Bogdanova N.N., Kiselev V.I. [Metals in river waters of the Primorsky Territory]. *Geochemija.* V. 1 (2007): pp. 79–88. (In Russ.).
6. Abou-Shanab R., Berkum V.P., Angle J. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere.* V. 68 (2007): pp. 360–367. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.12.051.
7. Abrantes M.C., Kok J., Lopes M. de F.S. *Enterococcus faecalis* zinc-responsive proteins mediate bacterial defence against zinc overload, lysozyme and oxidative stress. *Microbiology.* V. 160 (2014): pp. 2755–2762. DOI: 10.1099/mic.0.080341-0.
8. Arguello J.M., Raimunda D., Padilla-Benavides T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* V. 3, No. 73 (2013): pp. 1–14. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00073.
9. Ayangbenro A.S., Babalola O.O. A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* V. 14, No. 94 (2017): pp. 1–16. DOI: 10.3390/ijerph14010094.
10. Barbosa J., Borges S., Teixeira P. Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food. *International Journal of Food Microbiology.* V. 191 (2014): pp. 144–148. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.009.

11. Burgmann H., Frigon D., Gaze W.H., Manaia C.M., Pruden A., Singer A.C., Smets B.F., Zhang T. Water, and sanitation: an essential battlefront in the war on antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol. Ecol.* V. 94 (2018): pp. 1-14. DOI: 10.1093/femsec/fiy101.
12. Butaye P., Devriese L.A., Haesebrouck F. Differences in Antibiotic Resistance Patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Farm and Pet Animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* V. 45, No. 5 (2001): pp. 1374-1378. DOI: 10.1128/AAC.45.5.1374-1378.2001.
13. Cesare Di A., Pasquarelli S., Vignaroli C., Paroncini P., Luna G.M., Manso E., Biavasco F. The marine environment as a reservoir of enterococci carrying resistance and virulence genes strongly associated with clinical strains. *Environmental Microbiology Reports.* V. 6, No. 2 (2014): pp. 184-190. DOI: 10.1111/1758-2229.12125.
14. Frei A., Verderosa A.D., Elliott A.G., Zuegg J., Blaskovich M.A.T. Metals to combat antimicrobial resistance. *Nature Reviews Chemistry.* V. 7 (2023): pp. 202-224. DOI:10.1038/s41570-023-00463-4.
15. Fu F., Wang Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *J. Environ. Manage.* V. 92 (2011): pp. 407-418. DOI: 10.1016/j.jenvman.2010.11.011.
16. Garrido A.M., Galvez A., Pulido R.P. Antimicrobial Resistance in Enterococci. *J. Infect. Dis. Ther.* V. 2, No. 4 (2014): pp. 1-7. DOI: 10.4172/2332-0877.1000150.
17. Gin K.Y.H., Goh S.G. Modeling the effect of light and salinity on viable but non-culturable (VBNC) *Enterococcus*. *Water Research.* V. 47, No. 10 (2013): pp. 3315-3328. DOI: 10.1016/j.watres.2013.03.021.
18. Gupta S., Graham David W., Sreekrishnan T.R., Ahammad S.Z. Heavy metal and antibiotic resistance in four Indian and UK rivers with different levels and types of water pollution. *Science of The Total Environment.* V. 857, No. 1 (2023): Art. 159059. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.159059.
19. Hasman H., Aarestrup F.M. tcrB, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* V. 46 (2002): pp. 1410-1416. DOI: 10.1128/aac.46.5.1410-1416.2002.
20. Jungmann J., Reins H.A., Schobert C., Jentsch S. Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature.* V. 361 (1993): pp. 369-371.
21. Li X., Krumholz L.R. Regulation of arsenate resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* G20 by an arsRBCC operon and an arsC gene. *J. Bacteriol.* V. 189 (2007): pp. 3705-3711. DOI: 10.1128/jb.01913-06.
22. Paplace J.M., Boutibonnes P., Auffray Y. Unusual resistance and acquired tolerance to cadmium chloride in *Enterococcus faecalis*. *J. Basic. Microbiol.* V. 36 (1996): pp. 311-317. DOI: 10.1002/jobm.3620360504.
23. Parsons C., Lee S., Kathariou S. Dissemination and conservation of cadmium and arsenic resistance determinants in *Listeria* and other Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology.* V. 113 (2020): pp. 560-569. DOI: 10.1111/mmi.14470.
24. Sadowy E., Luczkiewicz A. Drug-resistant and hospital-associated *Enterococcus faecium* from wastewater, riverine estuary and anthropogenically impacted marine catchment basin. *BMC Microbiology.* V. 14 No. 66 (2014): pp. 1-15. DOI: 10.1186/1471-2180-14-66.
25. Schwartz G.G., Reis I.M. Is cadmium a cause of human pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomark. Prev.* V. 9 (2000): pp. 139-145.
26. Shah S.B. Heavy Metals in the Marine Environment—An Overview. In: *Heavy Metals in Scleractinian Corals*. Springer Briefs in Earth Sciences. Springer, Cham, 2021, pp. 1-26. DOI: 10.1007/978-3-030-73613-2_1.
27. Skowron K., Jeleńska A., Paluszak Z., Szala B. Prevalence and distribution of VRE (vancomycin resistant enterococci) and VSE (vancomycin susceptible enterococci) strains in the breeding environment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* V. 23, No. 2 (2016): pp. 231-236. DOI: 10.5604/12321966.1203882.
28. Somerville G. A., Proctor R. A. At the crossroads of bacteria metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* V. 73 (2009): pp. 233-248. DOI: 10.1128/mmbr.00005-09.
29. Tsai K., Yoon K., Lynn A. ATP-dependent cadmium transport by the *cadA* cadmium resistance determinant in everted membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* V. 174 (1992): pp. 116-121. DOI: 10.1128/jb.174.1.116-121.1992.
30. Wiebelhaus N., Zaengle-Barone J.M., Hwang K.K., Franz K.J., Fitzgerald M.C. Protein folding stability changes across the proteome reveal targets of Cu toxicity in *E. coli*. *ACS Chem. Biol.* V. 16 (202): pp. 214-224. DOI: 10.1021/acscchembio.0c00900.
31. Wu G., Sun M., Liu P., Zhang X., Yu Z., Zheng Z., Chen Y., Li X. *Enterococcus faecalis* strain LZ-11 isolated from Lanzhou reach of the Yellow River is able to resist and absorb Cadmium. *Journal of Applied Microbiology.* V. 116 (2014): pp. 1172-1180. DOI: 10.1111/jam.12460.
32. Zhang S., Wang D., Wang Y., Hasman H., Aarestrup F.M., Alwathnani H.A., Zhu Y.G., Rensing C. Genome sequences of copper resistant and sensitive *Enterococcus faecalis* strains isolated from copper-fed pigs in Denmark. *Standards in Genomic Sciences.* V. 35 (2015): pp. 1-10.

33. Zhao X., Huang J., Lu J., Sun Y. Study on the influence of soil microbial community on the long-term heavy metal pollution of different land use types and depth layers in mine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* V. 170 (2019); pp. 218-226. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.11.136.

Статья поступила в редакцию 08.07.2024; одобрена после рецензирования 16.09.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 08.07.2024; approved after reviewing 16.09.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторах

С. С. Ускова – аспирант кафедры биоразнообразия и морских биоресурсов;

А. В. Мартынова – д-р мед. наук, профессор кафедры биоразнообразия и морских биоресурсов; профессор кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии.

Information about the authors

S. S. Uskova – postgraduate student of the department of biodiversity and marine bioresources;

A. V. Martynova – doctor of medical sciences, professor of the department of biodiversity and marine bioresources; professor of the Department of Epidemiology and Military Epidemiology.

Вклад авторов:

Ускова С. С. – написание исходного текста; итоговые выводы; статистическая обработка материала.

Мартынова А. В. – научное руководство; концепция исследования; развитие методологии; доработка текста; итоговые выводы.

Contribution of the authors:

Uskova S. S. – writing the draft; final conclusions; statistical processing of the material.

Martynova A. V. – research supervision; research concept; methodology development; text revision; final conclusions.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.2

EDN QMKUAW

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-401-411



Дифференцированная оценка воздействия биогенных полиаминов и алармонсинтетазы Rel_{Msm} на характер скольжения *Mycobacterium smegmatis*

Иван Вадимович Цыганов^{1✉, 4}, Лариса Юрьевна Нестерова^{2, 5}, Александр Георгиевич Ткаченко^{3, 6}

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

^{4–6} Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

^{1✉} zamegagurrendan@gmail.com

² larisa.nesterova@bk.ru

³ agtkachenko@iegm.ru

Аннотация. Разработан метод сравнительного анализа скользящих колоний бактерий, включающий оценку плотности расположения бактериальных клеток в монослое. С использованием данного метода исследовано влияние биогенных полиаминов и алармонсинтетазы Rel_{Msm} на скольжение *Mycobacterium smegmatis*. Показан разнонаправленный эффект спермидина и спермина на скольжение, усиление скольжения у штамма с делецией *rel_{Msm}*, а также отсутствие прямой связи между скольжением микобактерий и их гидрофобностью.

Ключевые слова: микобактерии, скольжение, полиамины, алармоны, адаптация бактерий

Для цитирования: Цыганов И. В., Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г. Дифференцированная оценка воздействия биогенных полиаминов и алармонсинтетазы Rel_{Msm} на характер скольжения бактериальных клеток *Mycobacterium smegmatis* // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 401–411. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-401-411>.

Благодарности: работа выполнена при поддержке министерства науки и высшего образования РФ (№ 124020500028-4).

MICROBIOLOGY

Original article

Differentiated impact assessment of the biogenic polyamines and alarmonesynthetase Rel_{Msm} on the sliding motility of *Mycobacterium smegmatis*

Ivan V. Tsyganov^{1✉, 4}, Larisa Yu. Nesterova^{2, 5}, Alexander G. Tkachenko^{3, 6}

^{1–3} Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Perm Federal Research Center of Ural Branch RAS

^{4–6} Perm State University, Perm, Russia

^{1✉} zamegagurrendan@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5030-7997>

² larisa.nesterova@bk.ru

³ agtkachenko@iegm.ru

Abstract. The present article is devoted to the method for comparative analysis of sliding colonies. This new method includes measuring the density of bacterial cells in a monolayer. Using this method, we studied the effect of biogenic polyamines and alarmonesynthetase Rel_{Msm} on *Mycobacterium smegmatis* sliding motility and showed a multidirectional effect of spermidine and spermine on sliding, as well as an increase in sliding motility by a strain with a *rel_{Msm}* deletion. It is also shown that there is no dependence between the sliding of mycobacteria and their hydrophobicity.

Keywords: mycobacteria, sliding motility, polyamines, alarmones, bacterial adaptation

For citation: Tsyganov I. V., Nesterova L. Yu. Tkachenko A. G. [Differentiated impact assessment of the biogenic polyamines and alarmonesynthetase Rel_{Msm} on the sliding motility of *Mycobacterium smegmatis*]. *Bul-*

Acknowledgments: the work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (№ 124020500028-4).

Введение

Способность к пространственному перемещению дает бактериям множество преимуществ. Оно облегчает колонизацию среды, позволяет избегать влияния неблагоприятных факторов или перемещаться в область оптимального микроокружения, в том числе в условиях макроорганизма (фактор вирулентности). Это способствовало приобретению бактериями в ходе эволюции разнообразных способов транслокации, как с помощью специализированных органелл, так и в их отсутствии [Henrichsen, 1972]. Скольжение – это вид пассивного перемещения по поверхности сред, который возможен за счет действия экспансивной силы, возникающей при делении клеток [Daffé, Draper, 1997; Martínez, Torello, Kolter, 1999]. Скольжение микобактерий не требует специализированных органелл, но становится возможным благодаря наличию в их клеточной оболочке гликопептидолипидов (ГПЛ) [Gupta et al., 2016; Hölscher, Kovács, 2017], образующих липидный слой, окружающий клеточную стенку подобно наружной мембране грамотрицательных микроорганизмов [Brennan, Nikaido, 1995; Ghosh, Indi, Nagaraja, 2013]. Согласно актуальной модели скольжения, ГПЛ придают гидрофобность поверхности бактериальной клетки, что снижает ее трение о гидрофильные поверхности сред, благодаря чему микобактерии формируют широкий монослой, а не группируются в трехмерные структуры [Recht et al., 2000]. Патогенные виды микобактерий также способны к скольжению [Schorey, Sweet, 2008]. Более того, способность к скольжению, как и биопленкообразование, прямо коррелирует с вирулентностью бактерий [Lai et al., 2018]. Скольжение по достаточно увлажненным поверхностям внутренних тканей макроорганизма ускоряет распространение патогена и усложняет борьбу с ним [Zegadło et al., 2023]. Таким образом, исследование механизмов скольжения и факторов, модулирующих этот процесс, является актуальной задачей современной микробиологии, которая на сегодняшний день остается одной из наименее изученных проблем в области физиологии микроорганизмов.

Бактерии постоянно находятся под воздействием множества факторов внешней среды, которые индуцируют адаптационные процессы в клетках. При этом изменяется синтез различных соединений, которые могут оказать влияние на свойства внешней оболочки и, следовательно, на скольжение бактерий. У патогенных штаммов микобактерий это отражается на их способности к колонизации. Поэтому исследование влияния адаптационных процессов на скольжение бактерий и различных факторов их модуляции может способствовать совершенствованию современных средств противомикобактериальной терапии. Одним из ключевых элементов адаптации микобактерий к стрессам является алармонсинтетаза Rel_{Msm} [Prossliner et al., 2018]. Данный фермент контролирует уровень алармона – гуанозинтетрафосфата (ppGpp) – благодаря способности как синтезировать, так и гидролизовать это соединение. Кроме того, известно, что ppGpp может модулировать свойства клеточной поверхности микобактерий, оказывая влияние на способность к скольжению [Gupta et al., 2016]. Другим известным фактором, который влияет на адаптацию бактерий к стрессу, являются биогенные полиамины. Данные соединения синтезируются в клетках различных организмов, включая эукариоты, чем объясняется их широкая распространенность в окружающей среде [Igarashi, Kashiwagi, 2010]. Микобактерии в ходе эволюции утратили способность к синтезу полиаминов [Zamakhaev et al., 2020], однако экзогенные молекулы способны модулировать процессы биопленкообразования [Nesterova, Tsyganov, Tkachenko, 2020]. Таким образом, полиамины предположительно могли бы опосредованно участвовать в модуляции скольжения.

Видимое уменьшение площади растущей колонии бактерий может быть вызвано как бактерицидным эффектом изучаемого фактора, так и подавлением скольжения клеток. Поэтому исследование влияния различных факторов на скольжение требует разработки специфических методов, позволяющих дифференцированно оценить скольжение бактериальных клеток в условиях одновременно происходящих процессов их пролиферации или гибели. Подобная дифференцированная оценка затруднена ввиду особенностей, присущих данному объекту исследования. Микобактерии обладают гидрофобной оболочкой, способствующей агрегации клеток, что затрудняет перенос бактерий в жидкую среду и подсчет их количества как при высевах на плотную среду, так и в камере Горяева. В свою очередь, наблюдение за «живым» монослоем и подсчет бактерий в стандартном поле зрения также затруднительны из-за большого количества бактерий и значительной скорости их перемещения.

Вышесказанное требует разработки нового подхода к изучению скользких колоний, который позволил бы дифференцировать факторы, влияющие непосредственно на подвижность, и исключить при этом изменение ростовых характеристик и выживаемость бактерий.

Материал и методика

Объекты исследования. Объектом исследования служили штаммы *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 (таблица). Штамм без делеций генов использовали в качестве контроля, с которым сравнивали результаты скольжения штамма с делецией гена *rel_{Msm}*.

Штаммы

[Strains]

Штамм	Источник
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	Штамм дикого типа [Mohan et al., 2015] (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, ATCC #700084)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155 Δrel_{Msm}	Штамм с одиночной делецией <i>rel_{Msm}</i> . Коллекция Лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (сконструирован сотрудниками лаборатории)

Условия культивирования. Бактериальную культуру выращивали на среде Middlebrook 7H9 («Himedia», Индия), в которую предварительно добавляли ампициллин (5 мкг/мл) и твин-80 (0.05%), в термостатируемом шейкере (37°C, 200 об/мин) до оптической плотности 1.0 (600 нм). Затем бактериальные клетки отмывали от питательной среды центрифугированием (5 мин., 13 000 об/мин) в физиологическом растворе до оптической плотности 0.2 (600 нм). Полученную культуру использовали в экспериментах по изучению скользких колоний *M. smegmatis*.

Для исследования скольжения готовили специальную среду Middlebrook 7H9 без глицерина с добавлением агарозы до концентрации 0.3% (полужидкий агар). После автоклавирования среду разливали в пластиковые чашки Петри диаметром 40 мм. При необходимости к среде добавляли полиамины до конечной концентрации 2 мМ. После этого чашки подсушивали при комнатной температуре в течение 24 часов. Инокулят в виде микрокапли (0.5 мкл) наносили на поверхность среды в центре чашки Петри. После полного впитывания капли чашки помещали в герметичный контейнер, где поддерживали постоянную относительную влажность на уровне 50%. Контейнер выдерживали в термостате (37°C) в течение 16 часов.

Определение гидрофобности бактерий. Культуру в экспоненциальной фазе, выросшую до оптической плотности 1.4 (590 нм), отмывали от питательной среды РUM-буфером [McNeil, Dennison, Parish, 2017] и доводили до плотности 0.8 (590 нм). Подготовленную бактериальную культуру вносили по 5 мл в стеклянные пробирки и добавляли гексадекан до концентрации 0.5% от общего объема, после чего интенсивно встряхивали в течение 15 секунд. После встряхивания пробы оставляли на 30 мин., а затем измеряли оптическую плотность водной фазы. Степень гидрофобности считали процентное отношение оптической плотности водной фазы после взаимодействия с гексадеканом к изначальной оптической плотности подготовленных проб (0.8, 590 нм).

Определение параметров скользких колоний. Выросшие скользкие колонии фотографировали при помощи фотоаппарата («Olympus», Япония) для последующего определения их площади, а затем исследовали монослой без применения красителей непосредственно в чашках Петри при 400-кратном увеличении с помощью микроскопа МИКМЕД-6 («ЛОМО», Россия), оборудованного цифровой камерой МС 6.3 («ЛОМО», Россия) и фазово-контрастным устройством. Метод фазового контраста, как известно, основан на принципе интерференции. Световая волна, попавшая на объект исследования (бактериальные клетки), после прохождения через кольцевую диафрагму изменяет фазу колебаний по сравнению с другими волнами. Из-за разности фаз световых волн бактерии выглядят темными образованиями на светлом фоне свободного пространства. Этот результат можно зафиксировать на камеру. Бактериальный монослой фотографировали с помощью цифровой камеры МС 6.3.

Для анализа микрофотографий с целью получения цифровых данных о локальном межклеточном пространстве и площади колоний использовали программу Adobe Photoshop CC 2015.5 («Adobe», США). Площадь колоний определяли путем подсчета количества пикселей, которые занимает колония на фотографии. Зная диаметр чашки, определяли количество пикселей, приходящихся на всю площадь поверхности чашки и подсчитывали площадь (мм²), приходящуюся на 1 пиксель (формула 1):

$$S_{\pi} = \left(\frac{L_d}{N_{\pi}} \right)^2, \quad (1)$$

где S_{π} – реальная площадь, соответствующая одному пикселю на фотографии, L_d – фиксированный стандартный диаметр чашки Петри, N_{π} – количество пикселей, приходящихся на отрезок L_d на фотографии.

Для определения количества межклеточного пространства на цифровых фотографиях с помощью программы Adobe Photoshop с использованием инструмента «зернистость фотопленки», а также изменения контрастности и яркости изображение переводили в альтернативное черно-белое состояние, в котором вся поверхность чашки была представлена только двумя видами пикселей: черными, приходящимися на бактериальные клетки, и белыми, занимающими поверхность, свободную от бактериальных клеток, включая межклеточное пространство. Межклеточное пространство определяли как выраженную в процентах часть белых пикселей от общего их количества на фотографии (формула 2):

$$D_{\text{мкп}} = \frac{\Sigma_{\text{бп}}}{\Sigma_{\text{п}}} \times 100\%, \quad (2)$$

где $D_{\text{мкп}}$ – доля межклеточного пространства, $\Sigma_{\text{бп}}$ – сумма пикселей, которую занимает межклеточное пространство на микрофотографиях, $\Sigma_{\text{п}}$ – сумма всех пикселей на микрофотографии.

Важным условием подобного анализа является максимально точное разграничение областей с разными значениями, особенно в случаях, когда бактерии плотно прилегают друг к другу. Этот фактор зависит как от разрешения камеры, так и от программных возможностей анализа. Благодаря описанному ранее методу обработки изображений нам удалось максимально точно сохранить реальное соотношение между межклеточным пространством и областями, занятыми бактериальными клетками.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета стандартных программ Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2006). На рисунках 3, 5 отражены средние значения, а вертикальными отрезками – ошибка среднего. Оценка статистической значимости различий произведена с использованием Т-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p \leq 0.05$. На рисунке 4 отражены медианные значения, вертикальными отрезками обозначены первые и третьи квартили. Оценка статистической значимости различий произведена с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p \leq 0.05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что процесс скольжения осуществляется за счет формирования момента силы, возникающего в точке соприкосновения клеток в процессе их роста и деления. Вектор момента силы ориентирован в направлении наименьшего сопротивления. Это определяется множеством факторов, включая свойства поверхности скольжения, физиологические и метаболические параметры клеток, определяющие строение клеточной поверхности, скорость роста и деления, а также многие другие, природа которых до настоящего времени остается неизвестной. Горизонтальное скольжение клеток вдоль поверхности традиционных плотных питательных сред или в отсутствие факторов скольжения затруднено. Это приводит к тому, что в процессе деления все больше начинает преобладать вектор момента силы, направленный вертикально по отношению к поверхности среды, что сопровождается «наслоением» вновь образованных клеток на своих предшественников и формированием «традиционных» многослойных колоний сравнительно небольшого диаметра.

В отличие от этого, при благоприятных условиях (увлажненная поверхность, продукция факторов скольжения или специфические особенности бактериальной поверхности) перемещение клеточного монослоя в скользящей колонии происходит преимущественно горизонтально, в направлении наименьшей скученности клеток и преобладания свободного межклеточного пространства. Исходя из этого, следует, что воздействие какого-либо фактора, повышающего способность клеток к скольжению, можно оценить по возрастанию свободного пространства между бактериями (межклеточного пространства) и, соответственно, возрастания диаметра скользящей колонии. Наоборот, условия, замедляющие скольжение, вызывают снижение величины межклеточного пространства и диаметра скользящей колонии.

Для определения параметров, характеризующих скольжение клеток *M. smegmatis*, нами разработан метод, основанный на компьютерном анализе цифровых микрофотографий скользящих колоний, полученных с использованием фазово-контрастной микроскопии (см. раздел «Материалы и методы»). Суть метода заключается в том, чтобы с помощью программной обработки изображений преобразовать данные так, чтобы все области пикселей на фото принимали только одно из этих двух значений, а именно: равное нулю – для области, занимаемой бактериями («черные пиксели»), и значение, равное 255 («белые пиксели») – для области межклеточного пространства (рис. 1).

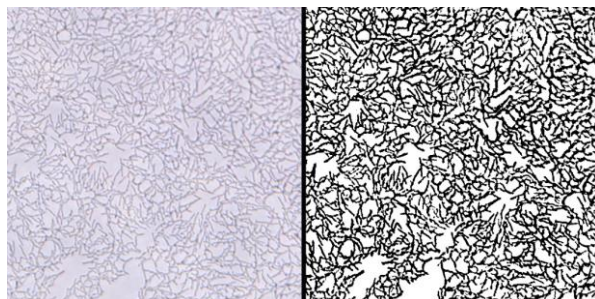


Рис. 1. Результат изменения фотографии монослоя *M. smegmatis*. Слева – изображение до обработки, справа – изображение после обработки

[Result of modifying *M. smegmatis* monolayer photo:
Left – before modifying, right – after modifying]

Использование данного метода дало возможность оценивать плотность расположения бактерий (формула 2, «Материалы и методы исследований»). Кроме того, при необходимости и при соблюдении определенных условий (небольшие различия в размерах бактерий и отсутствие наслоений бактерий друг на друга), метод может использоваться для вычисления количества бактерий в поле зрения микроскопа посредством деления значения суммы черных пикселей на их число, приходящееся на 1 бактериальную клетку.

С помощью данного метода нами изучено дифференцированное влияние на скольжение микобактерий внутренних и внешних факторов адаптации – гена алармонсинтетазы Rel_{Msm} и экзогенных полиаминов – спермидина и спермина – в концентрации 2 мМ.

Проведенное нами ранее сравнительное исследование показало отсутствие значимых отличий ростовых параметров у родительского и делеционного штамма *M. smegmatis*, лишенного гена rel_{Msm} , [Tsyanov, Tkachenko, 2022]. В то же время делеция данного гена приводила к почти двукратному увеличению площади скользящей колонии (рис. 2 А, В). Алармонсинтетаза Rel_{Msm} регулирует уровни ppGpp, который, в свою очередь, способствует накоплению полифосфатов и, таким образом, влияет на биопленкообразование [Chakraborty, Kumar, 2019], скольжение [Gupta, Kasetty, Chatterji. 2015], вирулентность патогенных штаммов [Petchiappan, Naik, Chatterji. 2020] и процессы адаптации микобактерий к стрессу [Primm et al., 2000]. Следует отметить, что полученные нами данные не согласуются с более ранними исследованиями скольжения штамма с аналогичной делецией [Gupta, Kasetty, Chatterji. 2015]. Это, вероятно, связано с тем, что свойства среды, использованной для изучения скольжения, в нашем эксперименте отличались от таковых для среды, использованной упомянутыми авторами. Мы следовали рекомендациям, данным в описании метода, разработанного для выращивания скользящих колоний микобактерий, согласно которым среда не должна содержать источников углерода [Martinez, Torello, Kolter, 1999]. В отличие от этого, в исследовании, проведенном Gupta с соавторами, в среде присутствовала глюкоза, что могло оказать значительное воздействие на фенотип колонии. Из результатов этих авторов следует, что штамм без делеций обладает способностью к скольжению, но образованная при этом колония по виду не является монослоем и представляет собой трехмерную структуру. Выявленные особенности, с одной стороны, подтверждают важность исследования связи между скольжением и регуляторами бактериального стресса, но с другой – требуют более корректного подхода к его методической части, включая состав питательной среды, что учтено в нашей работе.

Полиамины спермидин и спермин статистически значимо влияли на скольжение микобактерий (рис. 2В). Несмотря на то, что оба из использованных нами полиаминов обладают положительным зарядом, их различия по молекулярной массе и величине заряда, по-видимому, являются причиной разнонаправленности их эффектов на скольжение. Спермидин увеличивал площадь скользящих колоний обоих штаммов, тогда как спермин – уменьшал.

В обоих случаях изменения монослоя колоний на микроуровне прямо коррелировали с изменениями их площадей. Если колония микобактерий в присутствии какого-либо фактора увеличивалась в размерах, это приводило к возрастанию доли межклеточного пространства, и наоборот. Бактерии в скользящей колонии штамма с делецией rel_{Msm} были расположены значительно дальше друг от друга, что прямо коррелировало с увеличением площади всей колонии. Присутствие в среде спермидина также способствовало росту площади и межклеточного пространства. В отличие от этого, внесение в среду спермина приводило к обратному результату (рис. 2А).

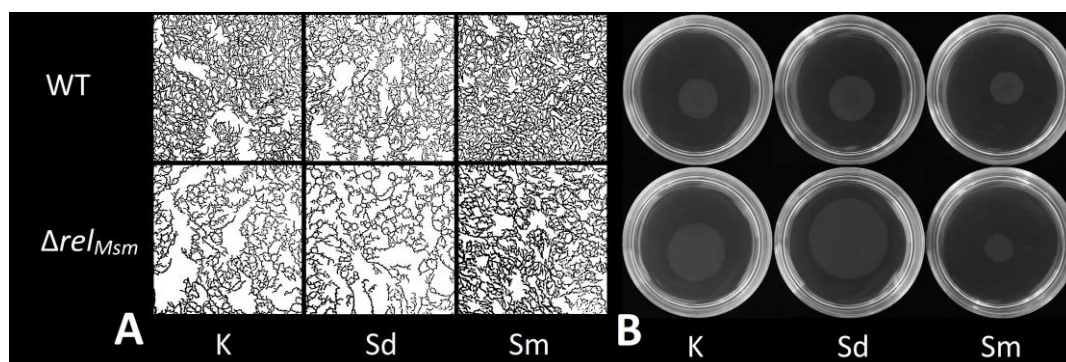


Рис. 2. Влияние полиаминов и алармонсинтетазы rel_{Msm} на скольжение *M. smegmatis*:

А – микрофотографии монослоя колоний, В – скользящие колонии *M. smegmatis*,
WT – штамм *M. smegmatis* mc² 155 без делеций генов, Δrel_{Msm} – штамм *M. smegmatis* mc² 155 с делецией гена rel_{Msm} , К – без добавок полиаминов, Sd – спермидин, Sm – спермин

[Effect of polyamines and alarmon synthetase rel_{Msm} on *M. smegmatis* sliding motility:

A – *M. smegmatis* sliding colony monolayer, B – *M. smegmatis* sliding colony,

WT – *M. smegmatis* mc² 155 strain, Δrel_{Msm} – *M. smegmatis* mc² 155 with rel_{Msm} deletion, К – without polyamines, Sd – spermidine, Sm – spermine]

Для того, чтобы сделать достоверный вывод о плотности расположения бактериальных клеток в монослое, мы разработали метод преобразования полученных визуальных данных в числовые значения, пригодные для статистической обработки. Учитывая описанные проблемы, связанные с физиологическими особенностями микобактерий (см. «Введение»), в данной работе проведена оценка изменения пространства между клетками. Для этого фотографии монослоя обрабатывали согласно использованному нами методу (см. «Материалы и методы»), позволяющему охарактеризовать величину межклеточного пространства в поле зрения микроскопа. Благодаря этому нам удалось количественно оценить соотношение пространства между бактериями в монослое и пространства, занимаемого клетками. Для того, чтобы исключить разброс значений в разрешении фотографий, межклеточное пространство оценивали как процентную величину от общей площади поля зрения.

В ходе сравнительного исследования межклеточного пространства в скользящих колониях *M. smegmatis* было установлено, что как полиамины, так и отсутствие Rel_{Msm} статистически значимо влияли на данный параметр. Спермидин и делеция *relMsm* приводили к значительному увеличению количества свободного пространства, в то время как спермин концентрации уменьшал его. При этом эффекты полиаминов и делеции суммировались (рис. 3). Поскольку данные факторы не влияли на скорость роста микобактерий [Tsyganov, Tkachenko, 2022], изменение плотности бактерий в колонии отражалось на ее площади.

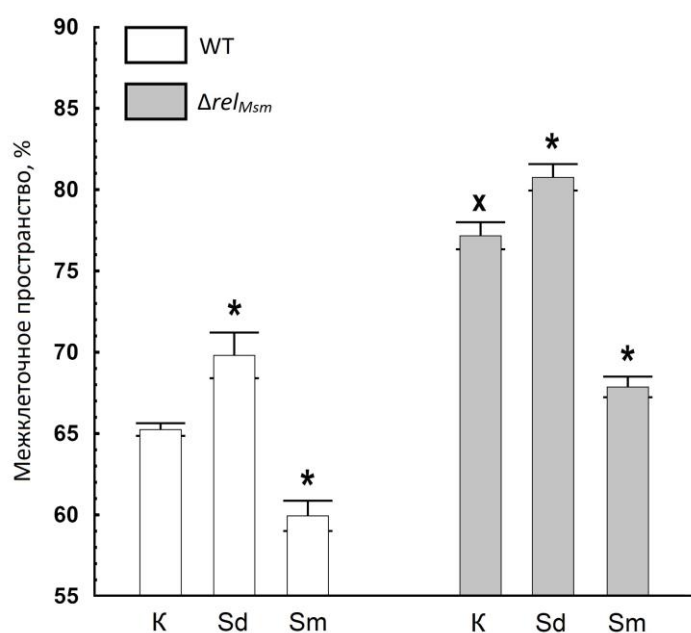


Рис. 3. Изменение межклеточного пространства колоний штаммов *M. smegmatis* в присутствии полиаминов:

WT – штамм *M. smegmatis* mc² 155 без делеций генов, Δ*relMsm* – штамм *M. smegmatis* mc² 155 с делецией гена *relMsm*, K – без добавок полиаминов, Sd – спермидин, Sm – спермин.

* – статистически значимые отличия от площади контроля соответствующего штамма без добавки полиамина,

x – статистически значимые отличия от площади колонии родительского штамма WT (с использованием Т критерия Стьюдента, p≤0.05)

[Changes in the intercellular space of colonies of *M. smegmatis* strains with polyamines:

WT – *M. smegmatis* mc² 155 strain, Δ*relMsm* – *M. smegmatis* mc² 155 with *relMsm* deletion, K – without polyamines, Sd – spermidine, Sm – spermine.

* – statistically significant differences from the control area of the corresponding strain without the addition of polyamine, x – statistically significant differences from the colony area of the WT strain (using the T-test, p≤0.05)]

При сравнительном анализе площадей скользящих колоний *M. smegmatis* и доли межклеточного пространства на микрофотографиях данных колоний становится заметна положительная корреляция между данными параметрами (рис. 3, 4). Увеличение или уменьшение площади всегда сопровождалось соответствующим возрастанием или снижением межклеточного пространства в скользящих колониях микобактерий.

Таким образом, благодаря применению разработанного нами метода удалось статистически достоверно дифференцировать эффекты ограничения скольжения, вызываемые спермином, и усиление бактериального скольжения в присутствии спермидина. Кроме того, нам удалось показать связь между присутствием алармонсинтазы Rel_{Msm} и характером скольжения *M. smegmatis*.

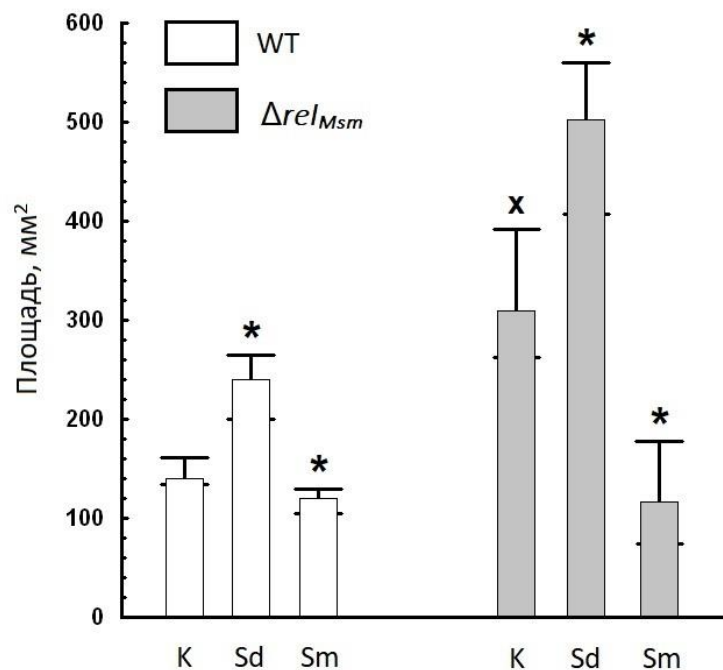


Рис. 4. Изменение площадей скользящих колоний штаммов *M. smegmatis* в присутствии полиаминов
WT – штамм *M. smegmatis* без делеций генов, Δrel_{Msm} – штамм *M. smegmatis* mc² 155 с делецией гена rel_{Msm} , K – без добавок полиаминов, Sd – спермидин, Sm – спермин.

* – статистически значимые отличия от площади контроля соответствующего штамма без добавки полиамина, x – статистически значимые отличия от площади колонии родительского штамма WT (с использованием критерия Мана-Уитни, $p \leq 0.05$)

[Changes in the areas of *M. smegmatis* sliding colony strains in the presence of polyamines:

WT – *M. smegmatis* mc² 155 strain, Δrel_{Msm} – *M. smegmatis* mc² 155 with rel_{Msm} deletion, K – without polyamines, Sd – spermidine, Sm – spermine.

* – statistically significant differences from the control area of the corresponding strain without the addition of polyamine,

x – statistically significant differences from the colony area of the WT strain (using the Man-Whitney test, $p \leq 0.05$)

Согласно ранее описанной модели [Recht et al., 2000], способность к скольжению связана с изменением структуры поверхности микобактерий. Гидрофобная оболочка, как предполагается в описанной модели, позволяет микобактериям снижать трение о поверхность среды и облегчать скольжение. Таким образом, можно было бы ожидать, что бактерии с более гидрофобной бактериальной оболочкой должны испытывать меньшее сопротивление среды, благодаря чему они должны были бы формировать большие по площади колонии, характеризующиеся более высоким значением межклеточного пространства. И наоборот, чем менее гидрофобна бактериальная поверхность, тем большее сопротивление должны испытывать клетки в процессе скольжения и, соответственно, тем более плотно они должны располагаться относительно друг друга, что уменьшало бы площадь всей колонии.

С целью исследования механизма влияния алармонсинтетазы Rel_{Msm} и полиаминов на скольжение нами изучено изменение гидрофобности поверхности бактериальных клеток *M. smegmatis*. Несмотря на статистически достоверные отличия в скольжении при добавлении в среду полиаминов, это не отражалось на гидрофобности родительского штамма (рис. 5). В то же время гидрофобность штамма с делецией гена rel_{Msm} , при добавлении в среду полиаминов увеличивалась.

При этом результаты оценки скольжения обоих штаммов микобактерий в присутствии поликатионов не только отличались от контроля, но и демонстрировали разнонаправленный характер: спермидин стимулировал скольжение, тогда как спермин подавлял его.

Аналогичный результат был получен при исследовании влияния делеции rel_{Msm} на гидрофобность микобактерий. Суспензия контрольного родительского штамма в водном буферном растворе демонстрировала снижение оптической плотности после контакта с органической фазой. Это подтверждало высокую гидрофобность клеток *M. smegmatis*. В свою очередь, оптическая плотность водной фазы штамма с делецией гена rel_{Msm} после экспозиции с гексадеканом практически не менялась, что свидетельствует о снижении гидрофобности по сравнению с родительским штаммом (рис. 5). Таким образом, согласно полученным нами данным, штамм, который способен лучше скользить по гидрофильной среде, обладает более гидрофильной оболочкой, что противоречит ранее опубликованной модели скольжения [Recht et al.,

2000]. Изменения в скольжении и гидрофобности штаммов микобактерий в присутствии полиаминов также не согласуются с общепринятой моделью. Спермидин и спермин, оказывавшие разнонаправленный эффект на скольжение, статистически значимо повышали гидрофобность у штамма с делецией гена *relMsm*, но не оказывали значительного эффекта на гидрофобность родительского штамма.

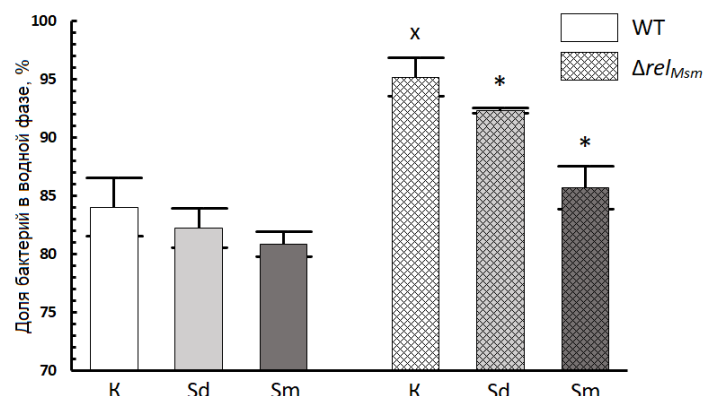


Рис. 5. Влияние полиаминов на гидрофобность бактериальной поверхности *M. smegmatis*:

K – без добавок полиаминов, Sd – спермидин 2 мМ, Sm – спермин 2 мМ,

* – статистически значимые отличия от площади контроля соответствующего штамма без добавки полиамина, x – статистически значимые отличия от площади колонии родительского штамма WT (с использованием критерия Т-критерий Стьюдента, $p \leq 0.05$)

[Changes in the areas of *M. smegmatis* sliding colony strains in the presence of polyamines:

K – without polyamines, Sd – spermidine, Sm – spermine.

* – statistically significant differences from the control area of the corresponding strain without the addition of polyamine,

x – statistically significant differences from the colony area of the WT strain (using the T-test, $p \leq 0.05$)

В то же время полученные нами результаты исследования гидрофобности и скольжения штаммов согласуются с нашими ранними исследованиями биопленкообразования *M. smegmatis* [Tsyganov, Tkachenko, 2022]. В цитируемой работе нами было показано, что отсутствие алармонсинтетаз у мутантных штаммов приводит к снижению количества ГПЛ в наружной оболочке, что, в свою очередь, вызывало снижение уровня гидрофобности клеточной поверхности и, по-видимому, было одной из причин нарушения процесса образования поверхностных биопленок микобактерий (пелликул). В конечном итоге поверхностные биопленки штаммов с делециями алармонсинтетаз фрагментировались и оседали на дно, в то время как пелликулы родительского штамма оставались целыми и продолжали удерживаться на поверхности [Tsyganov, Tkachenko, 2022]. При этом результаты, представленные нами в настоящей статье (рис. 5), дают возможность ретроспективно подтвердить, что восстановление целостности пелликул, наблюдаемое нами ранее у штаммов с делецией алармонсинтетазы в присутствии полиаминов, сопровождается возрастанием гидрофобности бактериальной оболочки. На этом основании можно прийти к заключению о том, что достаточно высокий уровень гидрофобности микобактерий необходим для биопленкообразования, однако не является ключевым фактором, регулирующим скольжение микобактерий. Установление полного механизма скольжения микобактерий является перспективой наших дальнейших исследований.

Заключение

Таким образом, с помощью разработанного метода анализа микобактериального монослоя изучена связь между скольжением и гидрофобностью микобактерий, а также оценена специфичность воздействия эндогенных и экзогенных факторов адаптации к стрессу на скольжение, представляющее собой один из признаков вирулентности микобактерий [Lai et al., 2018]. Нам удалось дифференцировать влияние на скольжение микобактерий алармонсинтетазы и биогенных полиаминов от влияния сопутствующих неспецифических изменений ростовых параметров, что ранее было затруднительно. Исследования монослойной структуры скользящей колонии посредством сравнения расположения бактерий относительно друг друга сделали возможным получение прямых доказательств модуляции скольжения за счет воздействия изучаемых факторов на этот процесс. Кроме того, использованный нами метод может быть адаптирован для исследования сопутствующих явлений, таких как агрегация бактерий или иных видов их поверхностного перемещения, например, роения (swarming) и подтягивания (twitching) [Цыганов, Нестерова, Ткаченко, 2021]. С помощью использованного в работе метода можно также значительно ускорить процесс подсчета бактерий, например, в камере Горяева. В наших исследованиях результаты

подсчета бактерий традиционным методом, в сравнении с использованным для оценки скольжения, отличались не более, чем на 5%, что соответствует стандартному р-значению $p \leq 0.05$.

Полученные данные позволяют сделать вывод об отсутствии прямой зависимости между наличием гидрофобной оболочки микобактерий и их способностью к скольжению по гидрофильным поверхностям. Это указывает на то, что механизм скольжения является более сложным процессом и его регуляция зависит не только от скорости деления бактерий и силы трения о поверхность. Установление реальных факторов регуляции скольжения позволит усовершенствовать методы борьбы с возбудителями микобактериозов.

Список источников

1. Цыганов И.В., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Скольжение бактерий: способ пассивного распространения без использования жгутиков и пилей (обзор) // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2021. Вып. 4. С. 263–274. DOI: 10.17072/1994-9952-2021-4-263-274.
2. Brennan P.J., Nikaido H. The envelope of mycobacteria // Annual Review of Biochemistry. 1995. Vol. 64. P. 29–63. DOI: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000333.
3. Chakraborty P., Kumar A. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: could we shorten the treatment of mycobacterial infections? // Microbial Cell. 2019. Vol. 6, № 2. P. 105–122. DOI: 10.15698/mic2019.02.667.
4. Daffé M., Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity // Advances in microbial physiology. 1997. Vol. 39. P. 131–203. DOI: 10.1016/s0065-2911(08)60016-8.
5. Ghosh S., Indi S.S., Nagaraja V. Regulation of lipid biosynthesis, sliding motility, and biofilm formation by a membrane-anchored nucleoid-associated protein of *Mycobacterium tuberculosis* // Journal of bacteriology. 2013. Vol. 195, № 8. P. 1769–1778. DOI: 10.1128/JB.02081-12.
6. Gupta K.R. et al. Regulation of growth, cell shape, cell division and gene expression by second messengers (p) ppGpp and c-di-GMP in *Mycobacterium smegmatis* // Journal of bacteriology. 2016. Vol. 198, № 9. P. 1414–1422. DOI: 10.1128/JB.00126-16.
7. 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* // Applied Environmental Microbiology. 2015. Vol. 81, № 7. P. 2571–2578. DOI: 10.1128/AEM.03999-14.
8. Henrichsen J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification // Bacteriological reviews. 1972. Vol. 36, № 4. P. 478–503. DOI: 10.1128/br.36.4.478-503.1972.
9. Hölscher T., Kovács Á.T. Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor // Environ Microbiology. 2017. Vol. 19, № 7. P. 2537–2545. DOI: 10.1111/1462-2920.13741.
10. Igarashi K., Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2010. Vol. 42, № 1. P. 39–51. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.07.009.
11. Lai L.Y. et al. Role of the *Mycobacterium marinum* ESX-1 Secretion System in Sliding Motility and Biofilm Formation // Frontiers in Microbiology. 2018. Vol. 9. Art. 1160. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01160
12. Martínez A., Torello S., Kolter R. Sliding motility in mycobacteria // Journal of bacteriology. 1999. Vol. 181, № 23. P. 7331–7338. DOI: 10.1128/JB.181.23.7331-7338.1999.
13. McNeil M.B., Dennison D., Parish T. Mutations in MmpL3 alter membrane potential, hydrophobicity and antibiotic susceptibility in *Mycobacterium smegmatis* // Microbiology. 2017. Vol. 163, № 7. P. 1065–1070. DOI: 10.1099/mic.0.000498.
14. Mohan A. et al. Complete Genome Sequences of a *Mycobacterium smegmatis* Laboratory Strain (MC² 155) and Isoniazid-Resistant (4XR1/R2) Mutant Strains // Genome Announcements. 2015. Vol. 3, № 1. Art. e01520-14. DOI: 10.1128/genomeA.01520-14.
15. Nesterova L.Yu., Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell-Surface Properties of *Mycobacterium smegmatis* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. Vol. 56, № 4. P. 387–394. DOI: 10.1134/S0003683820040110.
16. Petchiappan A., Naik S.Y., Chatterji D. RelZ-Mediated Stress Response in *Mycobacterium smegmatis*: ppGpp Synthesis and Its Regulation // Journal of Bacteriology. 2020. Vol. 202, № 2. Art. e00444-19. DOI: 10.1128/JB.00444-19.
17. Primm T.P. et al. III. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival // Journal of Bacteriology. 2000. Vol. 182. P. 4889–4898. DOI: 10.1128/jb.182.17.4889-4898.2000.
18. Prossliner T. et al. Ribosome Hibernation // Annual Review of Genetics. 2018. Vol. 23, № 52. P. 321–348. DOI: 10.1146/annurev-genet-120215-035130.
19. Recht J. et al. Genetic Analysis of Sliding Motility in *Mycobacterium smegmatis* // Journal of bacteriology. 2000 Vol. 182, № 15. P. 4348–4351. DOI: 10.1128/JB.182.15.4348-4351.2000.

20. Schorey J.S., Sweet L. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis // *Glycobiology*. 2008. Vol. 18, № 11. P. 832–841. DOI: 10.1093/glycob/cwn076.
21. Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Effect of biogenic polyamines on sliding motility of mycobacteria in the presence of antibiotics // *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii*. 2022. Vol. 26, № 5. P. 458–466. DOI: 10.18699/VJGB-22-56.
22. Zamakhaev M. et al. *Mycolicibacterium smegmatis* possesses operational agmatinase but contains no detectable polyamines // *International Journal of Mycobacteriology*. 2020. Vol. 9, № 2. P. 138–143. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_48_20.
23. Zegadło K. et al. Bacterial Motility and Its Role in Skin and Wound Infections // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, № 2. Art. 1707. DOI: 10.3390/ijms24021707.

References

1. Tsyganov I.V., Nesterova L.Yu., Tkachenko A.G. [Sliding motility: the way of passive spreading of bacteria without flagella and pili]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2021): pp. 263–274. (In Russ.) DOI: 10.17072/1994-9952-2021-4-263-274.
2. Brennan P.J., Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*. V. 64 (1995): pp. 29–63. DOI: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000333.
3. Chakraborty P., Kumar A. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: could we shorten the treatment of mycobacterial infections? *Microbial Cell*. 2019. V. 6, No. 2 (2019): pp. 105–122. DOI: 10.15698/mic2019.02.667.
4. Daffé M., Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in microbial physiology*. V. 39 (1997): pp. 131–203. DOI: 10.1016/s0065-2911(08)60016-8.
5. Ghosh S., Indi S.S., Nagaraja V. Regulation of lipid biosynthesis, sliding motility, and biofilm formation by a membrane-anchored nucleoid-associated protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*. V. 195, No. 8 (2013): pp. 1769–1778. DOI: 10.1128/JB.02081-12.
6. Gupta K.R., Baloni P., Indi S.S., Chatterji D. Regulation of growth, cell shape, cell division and gene expression by second messengers (p) ppGpp and c-di-GMP in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*. V. 198, No. 9 (2016): pp. 1414–1422. DOI: 10.1128/JB.00126-16.
7. 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*. *Applied Environmental Microbiology*. V. 81, No. 7 (2015): pp. 2571–2578. DOI: 10.1128/AEM.03999-14.
8. Henrichsen J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological reviews*. V. 36, No. 4 (1972): pp. 478–503. DOI: 10.1128/br.36.4.478-503.1972.
9. Hölscher T., Kovács Á.T. Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor. *Environ Microbiology*. 2017. V. 19, No. 7 (2017): pp. 2537–2545. DOI: 10.1111/1462-2920.13741.
10. Igarashi K., Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. V. 42, No. 1 (2010): pp. 39–51. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.07.009.
11. Lai L.Y., Lin T.L., Chen Y.Y., Hsieh P.F., Wang J.T. Role of the *Mycobacterium marinum* ESX-1 Secretion System in Sliding Motility and Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*. V. 9 (2018). Art. 1160. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01160.
12. Martínez A., Torello S., Kolter R. Sliding motility in mycobacteria. *Journal of bacteriology*. V. 181, No. 23 (1999): pp. 7331–7338. DOI: 10.1128/JB.181.23.7331-7338.1999.
13. McNeil M.B., Dennison D., Parish T. Mutations in MmpL3 alter membrane potential, hydrophobicity and antibiotic susceptibility in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*. V. 163, No. 7 (2017): pp. 1065–1070. DOI: 10.1099/mic.0.000498.
14. Mohan A., Padiadpu J., Baloni P., Chandra N. Complete Genome Sequences of a *Mycobacterium smegmatis* Laboratory Strain (MC² 155) and Isoniazid-Resistant (4XR1/R2) Mutant Strains. *Genome Announcements*. V. 3, No. 1 (2015). Art. e01520-14. DOI: 10.1128/genomeA.01520-14.
15. Nesterova L.Yu., Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell-Surface Properties of *Mycobacterium smegmatis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. V. 56, No. 4 (2020): pp. 387–394. DOI: 10.1134/S0003683820040110.
16. Petchiappan A., Naik S.Y., Chatterji D. RelZ-Mediated Stress Response in *Mycobacterium smegmatis*: ppGpp Synthesis and Its Regulation. *Journal of Bacteriology*. V. 202, No. 2 (2020). Art. e00444-19. DOI: 10.1128/JB.00444-19.
17. Primm T.P., Andersen S.J., Mizrahi V., Avarbock D., Rubin H., Barry C.E. III. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *Journal of Bacteriology*. V. 182 (2000): pp. 4889–4898. DOI: 10.1128/jb.182.17.4889-4898.2000.
18. Prossliner T., Skovbo Winther K., Sørensen M.A., Gerdes K. Ribosome Hibernation. *Annual Review of Genetics*. V. 23, No. 52 (2018): pp. 321–348. DOI: 10.1146/annurev-genet-120215-035130.

19. Recht J., Martínez A., Torello S., Kolter R. Genetic Analysis of Sliding Motility in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*. V. 182, No. 15 (2000): pp. 4348-4351. DOI: 10.1128/JB.182.15.4348-4351.2000.

20. Schorey J.S., Sweet L. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology*. V. 18, No. 11 (2008): pp. 832-841. DOI: 10.1093/glycob/cwn076.

21. Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Effect of biogenic polyamines on sliding motility of mycobacteria in the presence of antibiotics. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*. V. 26, No. 5 (2022): pp. 458-466. DOI: 10.18699/VJGB-22-56.

22. Zamakhaev M., Tsyganov I., Nesterova L., Akhova A., Grigorov A., Bespyatykh J., Azhikina T., Tkachenko A., Shumkov M. *Mycobacterium smegmatis* possesses operational agmatinase but contains no detectable polyamines. *International Journal of Mycobacteriology*. V. 9, No. 2 (2020): pp. 138-143. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_48_20.

23. Zegadło K., Gieroń M., Żarnowiec P., Durlak-Popińska K., Kręcis B., Kaca W., Czerwonka G. Bacterial Motility and Its Role in Skin and Wound Infections. *International Journal of Molecular Sciences*. V. 24, No. 2 (2023). Art. 1707. DOI: 10.3390/ijms24021707.

Статья поступила в редакцию 12.09.2024; одобрена после рецензирования 06.11.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 12.09.2024; approved after reviewing 06.11.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторах

И. В. Цыганов – инженер лаборатории адаптации микроорганизмов, младший научный сотрудник лаборатории органического синтеза;

Л. Ю. Нестерова – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов, доцент кафедры физиологии растений и экологии почв;

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

Information about the authors

I. V. Tsyganov – Engineer of the Laboratory of Adaptation of Microorganisms, Junior Researcher of the Laboratory of Organic Synthesis;

L. Yu. Nesterova – Candidate of Biology, Senior Scientist of the Laboratory of Adaptation of Microorganisms, Associate Professor, Department of Plant Physiology and Soil Ecology;

A. G. Tkachenko – Doctor of Medicine, Head of the Laboratory of Adaptation of Microorganisms, professor of the Department of microbiology and immunology.

Вклад авторов:

Цыганов И. В. – концепция исследования; развитие методологии; экспериментальная работа; обработка материала; написание исходного текста; итоговые выводы.

Нестерова Л. Ю. – экспериментальная работа; доработка исходного текста.

Ткаченко А. Г. – научное руководство; доработка исходного текста; итоговые выводы.

Contribution of the authors:

Tsyganov I. V. – research concept; methodology development; experimental work; processing of the material; writing the draft; final conclusions.

Nesterova L. Yu. – experimental work; text revision.

Tkachenko A. G. – research supervision; text revision; final conclusions.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.68

EDN RYVIXZ

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-412-420



Влияние психротолерантных метилотрофных бактерий на рост, пигментный состав и накопление белка и углеводов у микроводоросли *Chlorella vulgaris*

Дмитрий Юрьевич Шаравин^{1✉}, Полина Геннадьевна Беляева²,
Екатерина Михайловна Цещинская³, Валентина Владимировна Галямина⁴

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

^{1✉} dima-sharavin@yandex.ru

² belyaeva@psu.ru

³ reutskix@mail.ru

⁴ galhamina_v@mail.ru

Аннотация. Изучено влияние шести психротолерантных метилотрофных бактерий, выделенных из образцов мохово-лишайниковой растительности и водных объектов на территории Антарктических оазисов и горных районов республики Алтай на рост, пигментный состав и накопление белка и углеводов в культуре зелёной микроводоросли *Chlorella vulgaris* при температурах +10 и +20°C. Стандартные графики роста хлореллы без бактериальной суспензии при +20 и +10°C выходили на плато на 5–6 и 9 сутки соответственно, достигая 30 и 16×10⁶ кл/мл. Установлено, что пять из шести психротолерантных штаммов при совместном культивировании с хлореллой при температуре +10°C на численность хлореллы, содержание пигментов и концентрацию белка влияния не оказывали. Положительное воздействие выявлено только для хПрг3, в частности на содержание углеводов. Также обнаружен негативный эффект Бел19 на численность хлореллы и содержание пигментов при +10°C. При культивировании хлореллы со штаммами бактерий при температуре +20°C выявлено увеличение численности водорослей с хПрг3, концентрации хлорофилла *a* с Бел19 (119% от контроля), углеводов с изолятом хПрг17 и содержания внутриклеточного белка хлореллы с Ал5, Бел19, Бел62 и хПрг17.

Ключевые слова: *Chlorella vulgaris*, метилотрофы, пигменты, белки, углеводы, холодовой стресс

Для цитирования: Влияние психротолерантных метилотрофных бактерий на рост, пигментный состав и накопление белка и углеводов у микроводоросли *Chlorella vulgaris* / Д. Ю. Шаравин, П. Г. Беляева, Е. М. Цещинская, В. В. Галямина // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 412–420. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-412-420>.

Благодарности: работа выполнена в рамках Государственного задания № 124020500028-4.

MICROBIOLOGY

Original article

The effect of psychrotolerant methylotrophic bacteria on the growth, pigment content and accumulation of protein and carbohydrates in the microalgae *Chlorella vulgaris*

Dmitry Y. Sharavin^{1✉}, Polina G. Belyaeva², Ekaterina M. Tseshchinskaya³,
Valentina V. Galyamina⁴

^{1–4} Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russia

^{1✉} dima-sharavin@yandex.ru

² belyaeva@psu.ru

³ reutskix@mail.ru

⁴ galhamina_v@mail.ru

Abstract. The study is devoted to the effect of six psychrotolerant methylotrophic bacteria isolated from samples of moss-lichen community and water bodies, collected at the territory of Antarctic oases and mountainous region of the Altai republic on the growth, pigment content and accumulation of protein and carbohydrates

by the green microalgae *Chlorella vulgaris* at temperatures of +10°C and +20°C. Standard growth curves of chlorella without bacterial suspension at +20°C and +10°C reached the stationary growth phase on days 5-6 and 9, respectively, reaching 30 and 16×10⁶ cells/ml. It was found that five of the six psychrotolerant strains had no effect on the number of chlorella cells, pigment content and protein concentration when co-cultured with microalgae at the temperature of +10°C. A positive effect was found only for xPrg3, in particularly on the carbohydrate concentration. A negative effect of Bel19 on the cell number and pigment content at +10°C was also found. Inoculation of chlorella under the temperature of +20°C with same bacterial strains lead to increase in: cell number with the strain xPrg3, chlorophyll *a* with Bel19 (119% of the control), carbohydrates with the isolate xPrg17 and intracellular protein content with Al5, Bel19, Bel62 and xPrg17.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, methylotrophs, pigments, proteins, carbohydrates, cold stress

For citation: Sharavin D. Y., Belyaeva P. G., Tseshchinskaya E. M., Galyamina V. V. [The effect of psychrotolerant methylotrophic bacteria on the growth, pigment content and accumulation of protein and carbohydrates in the microalgae *Chlorella vulgaris*]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 4 (2024): pp. 412-420. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-412-420>.

Acknowledgments: the work was supported by the Russian Science Foundation, Grant No. 124020500028-4.

Введение

Криосфера представляет интерес как долгосрочное хранилище микробного разнообразия планеты, где доминируют различные виды холодоустойчивых микроорганизмов [Priscu, Christner, 2004; Miteva, 2008; Sajjad et al., 2020]. Психрофильные и психротолерантные бактерии способны синтезировать широкий спектр пигментов, экзополисахаридов, уникальные ферменты холодового шока и другие полимеры для защиты от воздействий окружающей среды [Hoover, Pikuta, 2010; Sajjad et al., 2020]. Предполагается, что психротолерантные и психрофильные микроорганизмы как составная часть растительно-микробных ассоциаций могут эффективно стимулировать рост и продуктивность сельскохозяйственных растений в условиях холодного климата [Balcazar et al., 2015].

Растения являются глобальным продуцентом C₁-соединений, а аэробные метилотрофные бактерии часто ассоциированы с ними и могут заселять поверхность листьев, присутствуя в семенах и ризосфере многих растений, поставляя растению-симбионту фитогормоны (ауксины, цитокинины), витамины и другие биологически активные вещества [Kutschera, 2007; Madhaiyan et al., 2007; Delmotte et al., 2009]. Ввиду того, что источником метанола могут служить не только наземные растения, но и водоросли, можно сделать вывод о глобальном распространении фитосимбиоза метилотрофных бактерий на поверхности планеты [Mincer, Aicher, 2016].

Зелёная микроводоросль *Chlorella vulgaris* наиболее интенсивно используется для биологической очистки сточных вод, получения зелёной биомассы, в качестве кормовой и пищевой добавки, в медицинской и парфюмерной промышленности. Биомасса хлореллы может служить источником разнообразных высокомолекулярных соединений: белков, жиров, углеводов, органических кислот, витаминов и т.д. Бактериальное микроокружение хлореллы (фикосфера) играет существенную роль в продуктивности экосистем и совместно с ассоциированными бактериями может использоваться в целях биоремедиации и производства зелёной водорослевой биомассы [Wirth et al., 2020].

Несмотря на интерес со стороны исследователей к бактериям, ассоциированным с представителями рода *Chlorella*, есть единичные работы, где метилотрофные бактерии рассматривались как симбионты хлореллы и микроводорослей в целом. Поэтому, особенно актуально в этой связи использование экстремофильных, в частности психрофильных метилотрофов для снижения негативного воздействия низких температур на хлореллу.

Цель работы – изучить возможность использования холодоустойчивых метилотрофов, выделенных из Антарктики и горных районов, для стимулирования роста и увеличения содержания пигментов и метаболитов *Chlorella vulgaris* при пониженных температурах.

Материалы и методы

Объектом исследований служил штамм *Chlorella vulgaris* IMBR-19 (получен из Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН) без бактериального загрязнения, поддерживаемый в стерильных условиях при оптимальной для данного штамма температуре +28°C (точность поддержания температуры ±0.1°C) на жидкой среде BG-11, с освещённостью около 6500 Лк и чередованием световых и темновых фаз 12ч/12ч [Rogers et al., 2020]. Колбы, содержащие микроводоросли, встряхивали вручную два раза в день.

Для выделения холодоустойчивых культур метилотрофов использовали образцы воды из водотоков, альгобактериальных матов и биообрастаний, почв, мха и лишайников, отобранные в ходе полевых работ 65-й Российской антарктической экспедиции и в горных районах республики Алтай. Для получения изо-

лятов метилотрофных бактерий использовали модифицированную среду «К» [Sharavin, Belyaeva, 2024]. Для выделения и культивирования метиловых бактерий, обладающих альтернативной метанолдегидрогеназой, вместо $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ добавляли смесь $\text{LaCl}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3 \times 4\text{H}_2\text{O}$ до концентрации 30 μM каждого. Культивирование метилотрофов осуществляли при +10°C. Оптическую плотность культур измеряли при длине волны 590 нм на спектрофотометре (Cary 100, Agilent Technologies). Бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 6 000 об/мин, осадок ресуспендировали в физрастворе. Влияние 6 штаммов метиловых бактерий (список штаммов представлен в таблице) на рост зелёной водоросли *Chlorella* оценивали в процессе их совместного культивирования в стеклянных ёмкостях объёмом 25 мл при температурах +10°C и +20°C. Засевная доза хлореллы содержала $1.5\text{--}1.6 \times 10^6$ кл./мл. Начальная pH культуральной среды составляла 7.0. Оптимальная температура роста для большинства из используемых в данной работе культур бактерий составляла +20°C.

Список использованных в работе культур бактерий
[List of bacterial cultures]

Штамм	Источник выделения	Координаты точки отбора	Оптимальная температура роста культуры, °C
Ал1	Вода с эпилимнионом из горного озера (Алтай)	49°52.6649' СШ 86°34.3694' ВД	20
Ал5	Обрастания на камнях, р. Кучерла (Алтай)	49°54.1298' СШ 86°24.9902' ВД	20
Бел19	Вода из руч. Станционный, вытекающего из оз. Китеж	62° 11,869' ЮШ 58° 57,777' ЗД	20
Бел62	Накипной лишайник (р-н ст. Беллинсгаузен, о. Кинг-Джордж)	62° 12.713' ЮШ 59° 00.374' ЗД	20
xPrG3	Мхи и водоросли на солнечной стороне скал (р-н ст. Прогресс, Холмы Ларсеманн)	69° 22.975' ЮШ 76° 23.252' ВД	20
xPrG17	Отложения чёрного цвета на дне озера (р-н ст. Прогресс, Холмы Ларсеманн)	69° 23.200' ЮШ 76° 22.538' ВД	12

Соотношение стартовых концентраций клеток бактерий и водорослей (при засеве) составляло 1:1. Подсчёт численности клеток хлореллы проводили в камере Горяева на микроскопе ZEISS Axiostar Plus (Германия) [Dvoretzky et al., 2017]. Эксперименты проведены в трёх биологических повторностях.

Определение пигментов микроводорослей производили в карбиноловых экстрактах на 14-е сутки культивирования. Аликвоты культур осаждали центрифугированием и отмывали от культуральной жидкости дистиллированной водой. Осаждённые клетки хлореллы разрушали при помощи ручного гомогенизатора. Затем в гомогенат добавляли холодный ацетон «хч» (80%), содержимое встряхивали и помещали в темноту на 12 часов при 4°C. После этого центрифугировали при 6 000 об/мин 10 мин. Надосадочную жидкость, которая представляла собой вытяжку пигментов, переносили в кварцевую кювету и спектрофотометрировали на Cary 100 (Agilent Technologies, США) при длинах волн, соответствующих максимуму абсорбции пигментов (663 нм – хлорофилл *a*, 645 нм – хлорофилл *b*, 470 нм – каротиноиды и 750 нм – поправка на неспецифическую абсорбцию и рассеяние света экстрактом). Концентрацию (мкг/мл) исследуемых пигментов – хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов – в клетках хлореллы определяли по формулам Н.К. Lichtenthaler [1987].

Количественную оценку внутриклеточного белка в разрушенных при помощи ручного гомогенизатора клетках осуществляли методом Бредфорда с использованием красителя Кумасси бриллиантовый синий G-250 (100 мг) при длине волны 595 нм [Bradford, 1976].

Общее содержание углеводов определяли по методу Герберт с антроновым реактивом при длине волны 625 нм. Концентрацию углеводов в пробах высчитывали по калибровочной кривой стандартных растворов глюкозы [Herbert, Phipps, Strange, 1971].

Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica 6.0 по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Согласно графику роста хлореллы (рис. 1), полученному опытным путём, через 2 дня культивирования количество клеток при +20°C достигало 11×10^6 кл./мл, в то время как при +10°C – не превышало 5×10^6 кл./мл. К пятым суткам плотность культур составляла 30 и 7×10^6 кл./мл при +20 и +10°C соответственно. Кривые роста выходили на плато на 5–6 сутки при +20°C и на 9 сутки при +10°C (до 16×10^6 кл./мл).

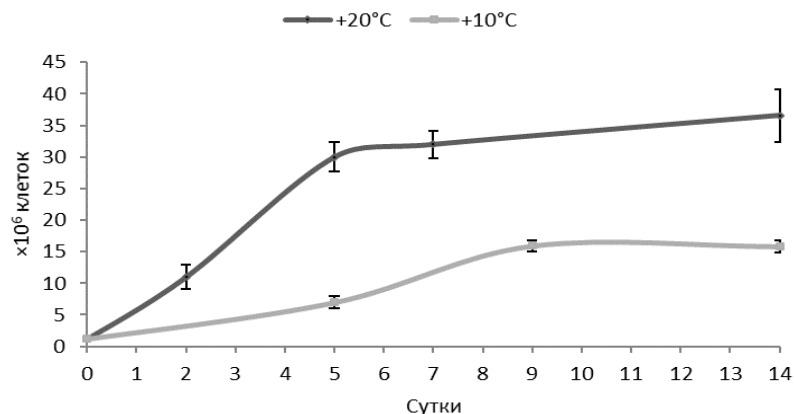


Рис. 1. Стандартный график роста хлореллы при +10°C и +20°C
[Standard chlorella growth curve at +10°C and +20°C]

При совместном культивировании хлореллы с тестируемыми штаммами метилотрофных бактерий стимулирующего влияния бактерий на численность микроводорослей при температуре +10°C на 7 и 14 сутки не выявлено (рис. 2). Более того, эффект штамма Бел19 был негативный. При температуре инкубации +20°C заметный положительный эффект на рост хлореллы оказал хПрг3 на 14е сутки (126% от контроля) (рис. 3). Остальные варианты опыта при +20°C не имели существенных отличий от контроля.

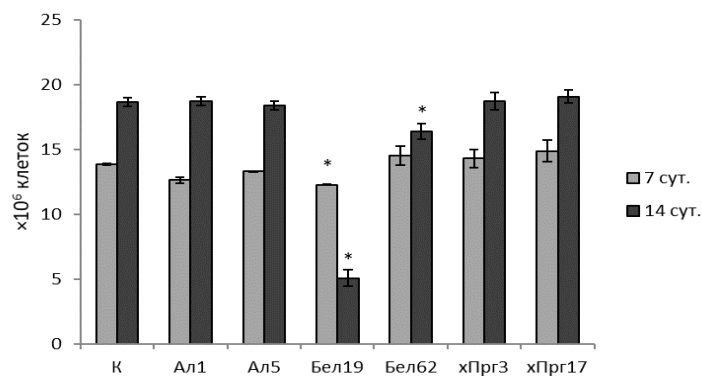


Рис. 2. Численность хлореллы на 7 и 14 сутки при инокулировании с культурами бактерий при +10°C
[The number of chlorella cells inoculated with bacterial cultures at +10°C on day 7 and 14]

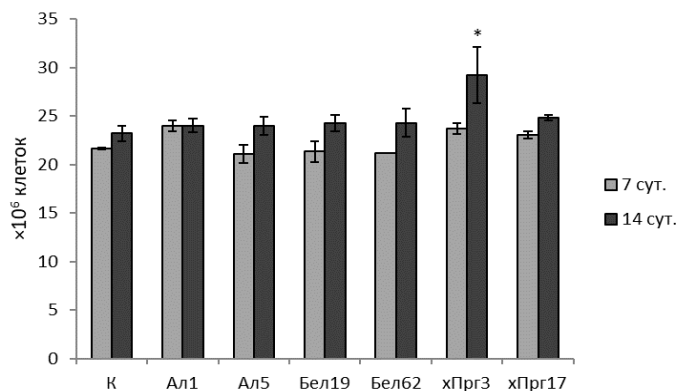


Рис. 3. Численность хлореллы на 7 и 14 сутки при инокулировании с культурами бактерий при +20°C
[The number of chlorella cells inoculated with bacterial cultures at +20°C on day 7 and 14]

На содержание пигментов микроводоросли при +10°C метилотрофные бактерии значимого положительного воздействия также не оказали. За исключением хлорофилла *a* у хПрг3 (3.13 мкг/мл), опытные варианты либо находились на уровне контрольных значений (К – 3.00 мкг/мл; хПрг17 – 2.98 мкг/мл),

либо имели более низкую концентрацию (рис. 4). Ранее, при +10°C, нами было выявлено стимулирующее влияние штамма хПрг3 как на численность, так и на содержание пигментов хлореллы [Шаравин и др., 2023].

В текущем эксперименте обнаружено негативное воздействие Бел19 как на содержание пигментов при +10°C, так и на численность клеток хлореллы. Однако при +20°C данный штамм оказал стимулирующее влияние на содержание хлорофилла *a*, превысив контроль на 19% (рис. 5), при этом численность соответствовала контрольным значениям (рис. 3). Количество каротиноидов при +20°C в эксперименте со штаммами Ал1, хПрг3 и хПрг17 на 14 сутки выше контрольных в среднем в 1.7 раза, что может быть связано со старением культуры водоросли.

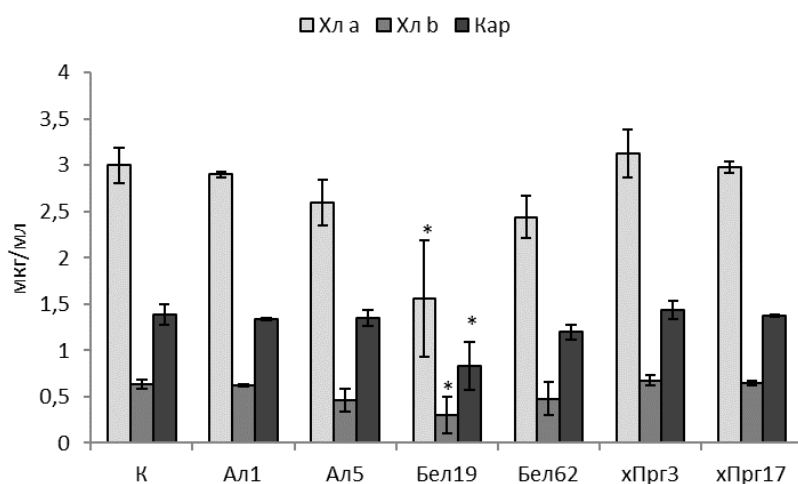


Рис. 4. Содержание пигментов, на 14 сутки (+10°C)
[Pigment content, within 14 days (+10°C)]

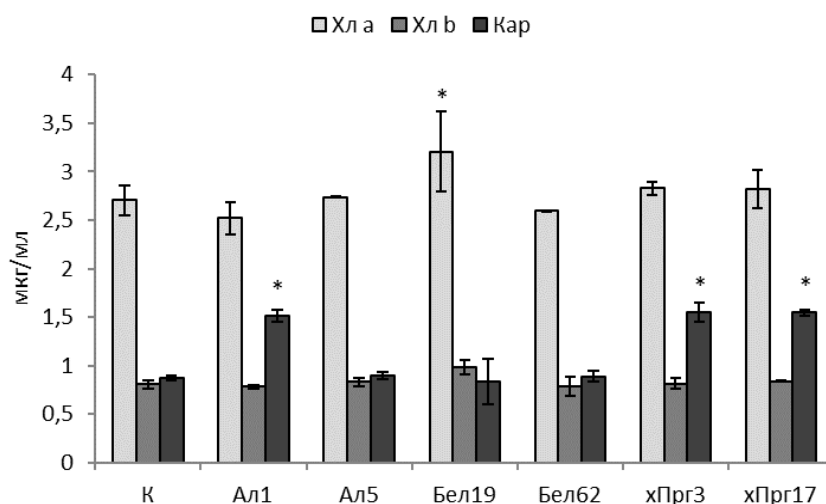


Рис. 5. Содержание пигментов, на 14 сутки (+20°C)
[Pigment content, within 14 days (+20°C)]

Эксперимент по совместному культивированию психротолерантных метилотрофов с хлореллой при +10 и +20°C выявил положительное влияние двух штаммов (хПрг3 на 16% при +10°C и хПрг17 на 37% при +20°C относительно контролей) на содержание углеводов в хлорелле (рис. 6). Концентрация углеводов в хлорелле в опытах при +10°C с Ал5, Бел19 и Бел62 не могла быть достоверно измерена из-за сильного развития бактериальных культур и невозможности полного разделения компонентов.

Данные по синтезу углеводов при воздействии низких температур, исходя из ряда источников – весьма противоречивы. Согласно [Lindberg et al., 2022], концентрация некоторых сахаров в *Ch. vulgaris* может существенно увеличиваться при пониженной (+5°C) температуре, по сравнению со значениями при +22°C. Однако показано, что при увеличении температуры роста относительно оптимальной (на 7–12°C), также может воз-

растать содержание углеводов [Dai et al., 2022]. Некоторые представители рода *Chlorella* склонны выделять растворимые сахара в культуральную среду с увеличением температуры, в то время как содержание внутриклеточных растворимых сахаров не изменялось с колебаниями температуры [Cao et al., 2016].

На содержание внутриклеточного белка хлореллы в опытах при температуре +20°C выявлено положительное воздействие Ал5, Бел19, Бел62 и хПрг17 (120, 144, 111 и 136% относительно контроля соответственно). При инокулировании хлореллы штаммами Ал1 и хПрг3 при температуре +10°C на 14-е сутки зафиксировано снижение количества белка в культуре микроводоросли относительно контроля (рис. 7). Как и в случае с углеводами, данные по внутриклеточным белкам хлореллы при +10°C с Ал5, Бел19 и Бел62 получить не удалось по вышеуказанной причине. В литературе показано, что *Chlorella* sp.-Arg накапливает белки, а также липиды при низких температурах (менее +15°C) [Cao et al., 2016]. Также отмечено, что разные штаммы хлореллы могут синтезировать большее количество белка как при повышенных, так и при пониженных (5–10°C) температурах [Cao et al., 2016; Idenyi et al., 2021]. В нашем случае используется относительно теплолюбивый штамм хлореллы и для него температура +10°C, исходя из графика роста (см. рис. 1), является существенным фактором, замедляющим рост культуры. При этом метилотрофные бактерии, продолжая своё развитие, вероятно, начинали подавлять микроводоросли, находясь в ограниченном объёме.

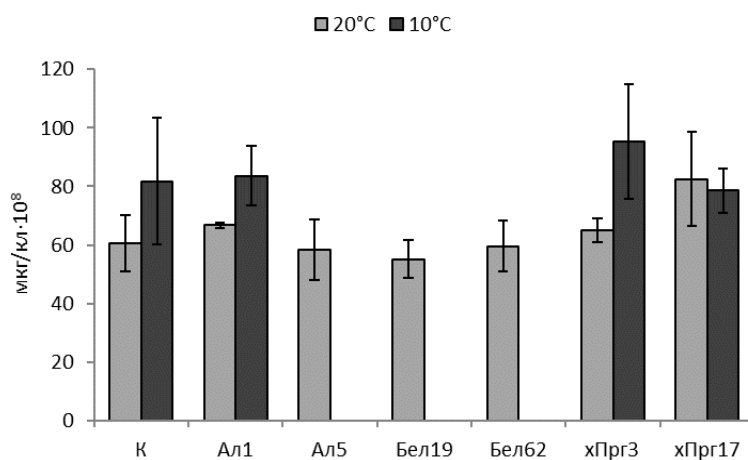


Рис. 6. Концентрация углеводов в культуре *Chlorella* с бактериями на 14 сутки при +20°C и +10°C
[Carbohydrate concentration in *Chlorella* culture with bacteria on day 14 at +20°C and +10°C]

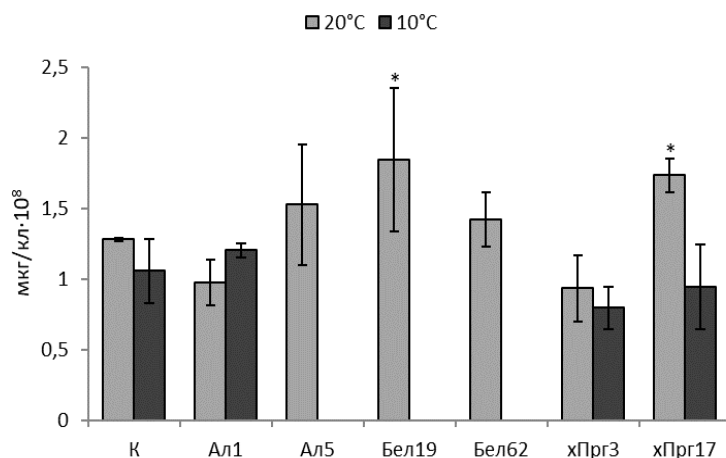


Рис. 7. Концентрация белка в культуре *Chlorella* с бактериями на 14 сутки при +20°C и +10°C
[Protein concentration in *Chlorella* culture with bacteria on day 14 at +20°C and +10°C]

В литературе можно встретить работы по изучению влияния психрофильного бактериального микроокружения холодоустойчивых микроводорослей, но не используемых в биотехнологии штаммов хлореллы. Упоминания метилотрофных компонент таких сообществ единичны, а данные о положительном влиянии психрофилов на морфологические и биохимические показатели представителей рода *Chlorella* не отличаются стабильностью.

Заключение

В результате проведённого исследования явного стимулирующего влияния психротолерантных метилотрофных бактерий на численность, содержание пигментов и концентрацию белка хлореллы при температуре +10°C не выявлено, но при этом обнаружено положительное влияние на содержание углеводов в хлорелле при культивировании с хПрг3 (116% от контроля).

Более значимое воздействие оказали используемые штаммы бактерий при сокультивировании с хлореллой при температуре +20°C. Заметный положительный эффект на численность культуры водоросли оказал только штамм хПрг3 (126% от контроля), на содержание пигментов, в частности хлорофилла *a* – Бел19 (119% от контроля), на содержание углеводов относительно контроля хПрг17 (137% от контроля). На содержание внутриклеточного белка хлореллы выявлено положительное воздействие с Ал5, Бел19, Бел62 и хПрг17 (120, 144, 111 и 136% от контроля соответственно).

Для использования психротолерантных метилотрофов стимуляции роста *Chlorella vulgaris* при пониженных температурах необходимы дальнейшие исследования по подбору оптимальных соотношений численности бактерий и водорослей для достижения устойчивого положительного эффекта.

Список источников

1. Шаравин Д.Ю. и др. Влияние психротолерантных метилотрофных бактерий на рост и концентрацию пигментов микроводоросли *Chlorella vulgaris* // Развитие современных систем земледелия и животноводства, обеспечивающих экологическую безопасность окружающей среды: материалы Всерос. науч. конф. Пермь, 2023. С. 398-404.
2. Balcazar W. et al. Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria // Microbiol. Res. 2015. Vol. 177. P. 1–7. DOI: 10.1016/j.micres.2015.05.001.
3. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 72. P. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
4. Cao K. et al. The eurythermal adaptivity and temperature tolerance of a newly isolated psychrotolerant Arctic *Chlorella* sp. // J. Appl. Phycol. 2016. Vol. 28. P. 877–888. DOI: 10.1007/s10811-015-0627-0.
5. Dai Y.R. et al. Thermal-tolerant potential of ordinary *Chlorella pyrenoidosa* and the promotion of cell harvesting by heterotrophic cultivation at high temperature // Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. Vol. 10. Art. 1072942. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1072942.
6. Delmotte N. et al. Community proteogenomics reveals insights into physiology of phyllosphere bacteria // PNAS. 2009. Vol. 106, № 38. P. 16428–16433. DOI: 10.1073/pnas.0905240106.
7. Dvoretzky D. et al. The effect of the complex processing of microalgae *Chlorella vulgaris* on the intensification of the lipid extraction process // Chem. Eng. Trans. 2017. Vol. 57. P. 721–726. DOI: 10.3303/CET1757121.
8. Herbert D., Phipps P.J., Strange R.E. Chapter III. Chemical analysis of microbial cells // Methods in microbiology / eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons. 1971. Vol. 5. P. 209–344.
9. Hoover R.B., Pikuta E.V. Psychrophilic and psychrotolerant microbial extremophiles in polar environments. CRS Press, 2010. P. 1–42. URL: <https://ntrs.nasa.gov/api/citations/20100002095/downloads/20100002095.pdf>.
10. Idenyi J.N. et al. Characterization of strains of *Chlorella* from Abakaliki, Nigeria, for the production of high-value products under variable temperatures // J. Appl. Phycol. 2021. Vol. 33. P. 275–285. DOI: 10.1007/s10811-020-02313-y.
11. Kutschera U. Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts // Plant Signaling & Behavior. 2007. Vol. 2, № 2. P. 74–78. DOI: 10.4161/psb.2.2.4073.
12. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods Enzymol. 1987. Vol. 148. P. 350–382. doi: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
13. Lindberg A. et al. Cold stress stimulates algae to produce value-added compounds // Biores. Technol. Rep. 2022. Vol. 19. Art. 101145. DOI: 10.1016/j.biteb.2022.101145.
14. Madhaiyan M. et al. *Methylobacterium oryzae* sp. nov., an aerobic pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice // IJSEM. 2007. Vol. 57. P. 326–331. DOI: 10.1099/ij.s.0.64603-0.
15. Mincer T.J., Aicher A.C. Methanol production by a broad phylogenetic array of marine phytoplankton // PLoS ONE. 2016. Vol. 11, № 3. Art. e0150820. DOI: 10.1371/journal.pone.0150820.
16. Miteva V.R. Bacteria in Snow and Glacier Ice // Margesin R. et al. Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. 2008. P. 31–50. DOI: 10.1007/978-3-540-74335-4_3.
17. Priscu J.C., Christner B.C. Earth's icy biosphere // Microbial diversity and bioprospecting. ASM Press, 2004. P. 130–145.
18. Rogers T.L. et al. Trophic control changes with season and nutrient loading in lakes // Ecol. Lett. 2020. Vol. 23, № 8. P. 1287–1297. DOI: 10.1111/ele.13532.

19. Sajjad W. et al. Pigment production by cold-adapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications // *Extremophiles*. 2020. Vol. 24. P. 447–473. DOI: 10.1007/s00792-020-01180-2.
20. Sharavin D.Y., Belyaeva P.G. Biotechnological potential of psychrotolerant methylobacteria isolated from biotopes of Antarctic oases // *Arch. Microbiol.* 2024. Vol. 206, № 323. P. 1–16. DOI: 10.1007/s00203-024-04056-7.
21. Wirth R. et al. *Chlorella vulgaris* and its phycosphere in wastewater: Microalgae-bacteria interactions during nutrient removal // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. Vol. 8. Art. 557572. DOI: 10.3389/fbioe.2020.557572.

References

1. Sharavin D.Y., Belyaeva P.G., Tseshchinskaya E.M., Galyamina V.V. [Influence of psychrotolerant methylotrophic bacteria on the growth and pigment content of microalgae *Chlorella vulgaris*]. *Razvitie sovremennykh system zemledelija i životnovodstva, obespečivajuich ekologičeskiju bezopasnost' okružajuščej sredy* [The development of modern farming and animal husbandry systems that ensure environmental safety. Materials of the All-Russian Scientific Conference]. Perm, 2023, pp. 398-404. (In Russ.).
2. Balcazar W., Rondón J., Rengifo M., Ball M.M., Melfo A., Gómez W., Yarzabal L.A. Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria. *Microbiol. Res.* V. 177 (2015): pp. 1–7. DOI: 10.1016/j.micres.2015.05.001.
3. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. V. 72 (1976): pp. 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
4. Cao K., He M., Yang W., Chen B., Luo W., Zou S., Wang C. The eurythermal adaptivity and temperature tolerance of a newly isolated psychrotolerant Arctic *Chlorella* sp. *J. Appl. Phycol.* V. 28 (2016): pp. 877-888. DOI: 10.1007/s10811-015-0627-0.
5. Dai Y.R., Wang D., Zhu Y.R., Yang K.X., Jiao N., Sun Z.L., Wang S.K. Thermal-tolerant potential of ordinary *Chlorella pyrenoidosa* and the promotion of cell harvesting by heterotrophic cultivation at high temperature. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 10 (2022). Art. 1072942. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1072942.
6. Delmotte N., Knief C., Chaffron S., Innerebner G., Roschitzki B., Schlappbach R., Mering C., Vorholt J.A. Community proteogenomics reveals insights into physiology of phyllosphere bacteria. *PNAS*. V. 106, No. 38 (2009): pp. 16428-16433. DOI: 10.1073/pnas.0905240106.
7. Dvoretzky D., Dvoretzky S., Temnov M., Akulinin E., Zuerro A. The effect of the complex processing of microalgae *Chlorella vulgaris* on the intensification of the lipid extraction process. *Chem. Eng. Trans.* V. 57 (2017): pp. 721-726. DOI: 10.3303/CET1757121.
8. Herbert D., Phipps P.J., Strange R.E. Chapter III Chemical analysis of microbial cells. In: Norris J.R., Ribbons D.W., eds. *Methods in microbiology*. 1971, V. 5, pp. 209-344.
9. Hoover R.B., Pikuta E.V. Psychrophilic and psychrotolerant microbial extremophiles in polar environments. CRS Press, 2010, pp. 1-42. URL: <https://ntrs.nasa.gov/api/citations/20100002095/downloads/20100002095.pdf>.
10. Idenyi J.N., Eya J.C., Ogbonna J.C., Chia M.A., Alam M.A., Ubi B.E. Characterization of strains of *Chlorella* from Abakaliki, Nigeria, for the production of high-value products under variable temperatures. *J. Appl. Phycol.* V. 33 (2021): pp. 275-285. DOI: 10.1007/s10811-020-02313-y.
11. Kutschera U. Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts. *Plant Signaling & Behavior*. V. 2, No. 2 (2007): pp. 74-78. DOI: 10.4161/psb.2.2.4073.
12. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* V. 148 (1987): pp. 350-382. DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
13. Lindberg A., Niemi C., Takahashi J., Sellstedt A., Gentili F.G. Cold stress stimulates algae to produce value-added compounds. *Biores. Technol. Rep.* V. 19 (2022): 101145. DOI: 10.1016/j.biteb.2022.101145.
14. Madhaiyan M., Kim B.Y., Poonguzhali S., Kwon S.W., Song M.H., Ryu J.H., Go S.J., Koo B.S., Sa T.M. *Methylobacterium oryzae* sp. nov., an aerobic pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice. *IJSEM*. V. 57 (2007): pp. 326-331. DOI: 10.1099/ijs.0.64603-0.
15. Mincer T.J., Aicher A.C. Methanol production by a broad phylogenetic array of marine phytoplankton. *PLoS ONE*. V. 11, No. 3 (2016). Art. e0150820. DOI: 10.1371/journal.pone.0150820.
16. Miteva V.R. Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. In: Margesin et al. (eds.) *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. 2008, pp. 31-50. DOI: 10.1007/978-3-540-74335-4_3.
17. Priscu J.C., Christner B.C. Earth's icy biosphere. In: *Microbial diversity and bioprospecting*, ASM Press, 2004, pp. 130-145.
18. Rogers T.L., Munch S.B., Stewart S.D., Palkovacs E.P., Giron-Nava A., Matsuzaki S.S., Symons C.S. Trophic control changes with season and nutrient loading in lakes. *Ecol. Lett.* V. 23, No. 8 (2020): pp. 1287-1297. DOI: 10.1111/ele.13532.

19. Sajjad W., Din G., Rafiq M., Iqbal A., Khan S., Zada S., Ali B., Kang S. Pigment production by cold-adapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. *Extremophiles*. V. 24 (2020): pp. 447-473. DOI: 10.1007/s00792-020-01180-2.

20. Sharavin D.Y., Belyaeva P.G. Biotechnological potential of psychrotolerant methylobacteria isolated from biotopes of Antarctic oases. *Arch. Microbiol.* V. 206, No. 323 (2024): 1-16. DOI: 10.1007/s00203-024-04056-7.

31. Wirth R., Pap B., Böjti T., Shetty P., Lakatos G., Bagi Z., Kovács K.L., Maróti G. *Chlorella vulgaris* and its phycosphere in wastewater: Microalgae-bacteria interactions during nutrient removal. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 8 (2020). Art. 557572. DOI: 10.3389/fbioe.2020.557572.

Статья поступила в редакцию 12.09.2024; одобрена после рецензирования 11.11.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 12.09.2024; approved after reviewing 11.11.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторах

Д. Ю. Шаравин – канд. биол. наук, младший научный сотрудник Лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии;

П. Г. Беляева – д-р биол. наук, старший научный сотрудник Лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии;

Е. М. Цещинская – инженер Лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии;

В. В. Галямина – канд. биол. наук, инженер Лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии.

Information about the authors

D. Y. Sharavin – candidate of biology, junior researcher of the Laboratory of cell immunology and nanobiotechnology;

P. G. Belyaeva – doctor of biology, senior scientist of the Laboratory of cell immunology and nanobiotechnology;

E. M. Tshchinskaya – engineer of the Laboratory of cell immunology and nanobiotechnology;

V. V. Galyamina – candidate of biology, engineer of the Laboratory of cell immunology and nanobiotechnology.

Вклад авторов:

Шаравин Д. Ю. – научное руководство; концепция исследования; написание исходного текста рукописи; итоговые выводы.

Беляева П. Г. – концепция исследования; развитие методологии; итоговые выводы.

Цещинская Е. М. – проведение лабораторных экспериментов.

Галямина В. В. – проведение лабораторных экспериментов.

Contribution of the authors:

Sharavin D. Y. – research supervision; research concept; writing the draft; final conclusions.

Belyaeva P. G. – research concept; methodology development; final conclusions.

Tshchinskaya E. M. – carrying out the experiments.

Galyamina V. V. – carrying out the experiments.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

ГЕНЕТИКА

Научная статья

УДК 575.22

EDN SUPORN

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-421-432



Ассоциации нарушений ядерной ДНК с индивидуальными вариантами генов системы репарации ДНК *APEX1*, *ERCC2*, *ERCC5*, *PARP1* и *hOGG1* у работников угольных теплоэлектростанций

**А. В. Марущак¹, А. В. Торгунакова^{1, 2}, Р. А. Титов^{1, 2}, О. А. Соболева^{1, 2},
В. И. Минина^{1, 2}**

¹ Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, Институт экологии человека, Кемерово, Россия

² Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

Авторы, ответственные за переписку: Анна Владимировна Марущак, marushchak.av@mail.ru и Варвара Ивановна Минина, vminina@mail.ru

Аннотация. Комбинации генетических вариантов и факторов окружающей среды ответственны за развитие многих заболеваний человека. Информация об индивидуальной способности накапливать повреждения ДНК необходима для развития разработки персонализированной профилактики заболеваний у населения, подвергшегося воздействию факторов окружающей среды. Угольные тепловые электростанции сжигают огромное количество угля и выделяют соответствующее количество токсичных газов, золы, летучих органических веществ. Элементы, входящие в состав угля, являются большой группой разнообразных загрязнителей, связанных с угрозами для здоровья человека и окружающей среды. Настоящая работа основана на определении рисков, которые связаны со здоровьем работников угольных теплоэлектростанций. Проведена оценка степени повреждений ДНК в связи с индивидуальной чувствительностью у 455 работников угольных теплоэлектростанций г. Кемерово и 533 жителей этого же региона, не связанных с производством. Для регистрации нарушений ДНК применялось микроядерное тестирование с цитокинетическим блоком на лимфоцитах периферической крови. Определение влияния генетических факторов на степень повреждения ДНК проводилось методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции полиморфных вариантов генов систем репарации ДНК *APEX1* rs1130409, *ERCC2* rs13181, *PARP1* rs1136410, *hOGG1* rs1052133 и *ERCC5* rs17655. Выявлены повышенные частоты нарушений ДНК у носителей гетерозиготного генотипа гена *APEX1* и минорных вариантов *APEX1*, *ERCC2*, *hOGG1* и *ERCC5*.

Ключевые слова: работники, угольные теплоэлектростанции, микроядерный тест, полиморфизм, гены репарации ДНК, *APEX1*, *ERCC2*, *PARP1*, *hOGG1*, *ERCC5*

Для цитирования: Ассоциации нарушений ядерной ДНК с индивидуальными вариантами генов системы репарации ДНК *APEX1*, *ERCC2*, *ERCC5*, *PARP1* и *hOGG1* у работников угольных теплоэлектростанций / А. В. Марущак, А. В. Торгунакова, Р. А. Титов, О. А. Соболева, В. И. Минина // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 421–432. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-421-432>.

GENETICS

Original article

Associations of nuclear DNA disorders with individual variants of the DNA repair system genes *APEX1*, *ERCC2*, *ERCC5*, *PARP1* and *hOGG1* in workers of coal thermal power plants

**A. V. Marushchak¹, A. V. Torgunakova^{1, 2}, R. A. Titov^{1, 2}, O. A. Soboleva^{1, 2},
V. I. Minina^{1, 2}**

¹ Federal Research Center of Coal and Coal-Chemistry SB RAS, Institute of human ecology, Kemerovo, Russia

² Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

Corresponding authors: Anna V. Marushchak, marushchak.av@mail.ru and Varvara I. Minina, vminina@mail.ru

Abstract. Combinations of genetic variants and environmental factors are responsible for the development of many human diseases. Information on individual capacity to accumulate DNA damages is essential to advance the development of personalized disease prevention in environmentally exposed populations. Coal-fired thermal power plants burn huge amounts of coal per year and emit corresponding amounts of toxic gases, ash, and volatile organic compounds. The elements that make up coal are a large group of diverse pollutants associated with threats to human health and the environment. The current work is based on identifying the risks associated with the health of workers at coal-fired thermal power plants. The study is devoted to the assessment of the DNA damage degree in connection with individual sensitivity in 455 workers of coal-fired thermal power plants in the city of Kemerovo and 533 residents of the same region not associated with production. The research materials are represented by 988 samples of peripheral venous blood from residents of the Kemerovo region. Control donors were selected according to the gender, age, and smoking status of coal-fired power plant workers. Micronucleus testing with a cytokinetic block on peripheral blood lymphocytes was used to register DNA disorders. Determination of the influence of genetic factors on the degree of DNA damage was carried out using allele-specific polymerase chain reaction of polymorphic variants of the DNA repair system genes *APEX1 rs1130409*, *ERCC2 rs13181*, *PARP1 rs1136410*, *hOGG1 rs1052133* and *ERCC5 rs17655*. Increased frequencies of DNA disorders were detected in carriers of the heterozygous genotype of the *APEX1* gene and minor variants of *APEX1*, *ERCC2*, *hOGG1* and *ERCC5*.

Keywords: workers, coal-fired thermal power plants, micronucleus test, polymorphism, DNA repair genes, *APEX1*, *ERCC2*, *PARP1*, *hOGG1*, *ERCC5*

For citation: Marushchak A. V., Torgunakova A. V., Titov R. A., Soboleva O. A., Minina V. I. [Associations of nuclear DNA disorders with individual variants of the DNA repair system genes *APEX1*, *ERCC2*, *ERCC5*, *PARP1* and *hOGG1* in workers of coal thermal power plants]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2024): pp. 421-432. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-421-432>.

Введение

Оценка всех видов веществ с точки зрения безопасности для здоровья человека проводится при помощи тестов на изучение генотоксичности. Генотоксические факторы не только могут убивать клетки, но и повреждать их генетический материал [Sommer, Buraczewska, Kruszewski, 2020]. Некоторые повреждения могут сохраняться в клетке при условии ее выживаемости и наследоваться при делении [Sommer, Buraczewska, Kruszewski, 2020]. Методы определения генотоксичности включают в себя изучение обратимых и необратимых повреждений структуры ДНК, а также нарушение механизмов сохранения геномной стабильности [Corvi, Madia, 2017]. Особые виды хромосомных повреждений удается зафиксировать при помощи микроядерного теста. Анализ микроядер может способствовать пониманию механизмов взаимодействия генетических факторов и эффектов окружающей среды, поскольку он считается маркером воздействия мутагенов внешней среды и генетической нестабильности. Данный метод является стандартизированным, позволяет проводить анализ нескольких типов ядерных повреждений [Vral, Fenech, Thierens, 2011].

Совокупность генетических вариантов и факторов окружающей среды является предиктором развития целого ряда заболеваний человека. Репарационные механизмы ДНК определяют результаты после выявления нарушений ДНК и необходимы для поддержания стабильности генома [Wang et al., 2022]. Под геномной нестабильностью подразумевают склонность генома к формированию мутаций [López-Gi, Pascual-Ahuir, Proft, 2023]. Такие процессы происходят при дисфункции механизмов репарации и репликации или увеличении воздействия канцерогенных факторов на организм [Langie et al., 2015].

Целостность генома измеряется увеличенной встречаемостью мутаций в геноме, например, модификациями в нуклеотидных последовательностях [Ferragut Cardoso et al., 2021]. К потере стабильности генома может привести экзогенно-индуцированное повреждение ДНК, вызываемое различными химическими факторами окружающей среды, радиационными агентами, наночастицами [Langie et al., 2015].

Информация об индивидуальной чувствительности к повреждениям ДНК необходима для развития разработки персонализированной профилактики заболеваний у населения, подвергшегося воздействию окружающей среды. Оценка индивидуальной изменчивости имеет решающее значение в выявлении биомаркеров не только для первичной профилактики заболеваний, в том числе рака, и ранней диагностики, но и для их лечения благодаря индивидуально скорректированной терапии [Nagel, Chaim, Samson, 2014].

Кузбасс расположен в юго-западной части Сибири и является одним из крупнейших угольных бассейнов мира [Labzovskii, Belikov, Damiani, 2022]. В столице Кузбасса, г. Кемерово, расположены три теплоэлектростанции (ТЭС), использующие в качестве топлива каменный уголь, – Кемеровская Государственная районная электрическая станция (ГРЭС), Кемеровская теплоэлектростанция и Ново-Кемеровская теплоэлектростанция (ТЭЦ).

На угольных теплоэлектростанциях сжигается огромное количество угля в год и выделяется не менее огромный объем углекислого газа, оксидов азота и серы, летучих органических веществ, золы [Munawer,

2018]. В состав угля входят элементы, которые определяют большую группу опасных для здоровья человека веществ [Hossain, Paul, Hasan, 2015]. В список таких элементов входят тяжелые металлы, которые представляют серьезную угрозу для здоровья человека из-за их широкого распространения и долгого хранения, которое приводит к накоплению в биологических системах [Balali-Mood et al., 2021]. Помимо этого, установлено, что воздействие высокого уровня шума на работников повышено на угольных теплоэлектростанциях по сравнению с электростанциями на природном газе или гидроэлектростанциями [Sarker et al., 2010a, 2010b].

В связи с этим целью данной работы является анализ частот цитогенетических повреждений в связи с унаследованными вариантами генов ферментов репарации ДНК: *APEX1 rs1130409*, *ERCC2 rs13181*, *PARP1 rs1136410*, *hOGG1 rs1052133* и *ERCC5 rs17655*.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации» (утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 2660). Дизайн исследования (кандидатное исследование по принципу случай-контроль) был одобрен локальным этическим комитетом Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН (г. Кемерово). Участие людей в исследовании базировалось на принципах добровольности и информированности о целях, методах и результатах работы.

Материалы исследования представлены 988 образцами периферической венозной крови жителей Кемеровской области. Было обследовано 455 работников угольных теплоэлектростанций г. Кемерово и 533 условно-здоровых жителей этого же региона, не связанных с промышленностью и составивших группу контроля (табл. 1). Контрольные доноры подбирались соответственно полу, возрасту и статусу курения работников угольных теплоэлектростанций.

Таблица 1

Характеристика исследуемых групп
[Characteristics of the studied groups]

Параметр		Работники	Группа сравнения
Пол	женщины	101	168
	мужчины	354	365
Средний возраст, $\mu \pm \text{SEM}$		$51,9 \pm 0,5$	$49,4 \pm 4$
Статус курения	курящие	169	170
	некурящие	286	363
Наличие хронических заболеваний	обладают	79	-
	не обладают	161	-
Всего		455	533

Примечание. μ – среднее значение; SEM – стандартная ошибка среднего.

Для определения степени повреждения ядерной ДНК применялся микроядерный тест с блокировкой цитокинеза на лимфоцитах периферической крови с рекомендациями М. Fenech [2007] и модификациями Ф. И. Ингель [2006]. В культуральные флаконы вносили 3 мл среды RPMI 1640, 0.8 мл эмбриональной телячьей сыворотки, 0.25 мл венозной крови, 0.05 мл фитогемагглютинаина и оставляли в инкубаторе при 37°C на 44 ч. По истечении 44 ч. в культуры вводили ингибитор цитокинеза цитохалазин В с конечной концентрацией 6 мкг/мл и продолжали инкубацию еще на 28 ч. Полученные клеточные культуры переносили в флаконы объемом 15 мл и центрифугировали 10 мин. при 1 000 rpm. Избавлялись от супернатанта, разбивали осадок и добавляли 6 мл охлажденного гипотонического раствора (0.125 М калий хлористый) для лизиса эритроцитов, перемешивали и добавляли 1 мл ледяного фиксатора Карнуа (3 объема метанола на 1 объем ледяной уксусной кислоты), перемешивали и центрифугировали 10 мин. при 1 000 rpm. Удаляли супернатант, разбивали осадок и вносили 9 мл ледяного метанол-уксусного фиксатора, перемешивали и выдерживали экспозицию при 4°C в течении 20 мин., центрифугировали 10 мин. при 1 000 rpm. Избавлялись от супернатанта, разбивали осадок и вносили 9 мл ледяного метанол-уксусного фиксатора, перемешивали и выдерживали экспозицию при 4°C на протяжении 50 мин. Центрифугировали 10 мин., удаляли супернатант и переносили полученный осадок во флаконы объемом 1.5 мл. Полученные суспензии переносили на предварительно обезжиренные и замороженные предметные стекла, выдерживали ночь и окрашивали 3% красителем Гимза. Полученные препараты просматривали на микроскопах Axio Scope.A1 (Zeiss, Германия) и Eclipse E100 (Nikon, Япония). Регистрировались 500 клеток любой ядерности, на стадии митоза и апоптоза, нарушения (микроядра, мосты, протрузии), после учитывали только двухъядерные лимфоциты и их нарушения, набирая количество данных клеток до 1 000 rpm. Критерии отбора двуядерных лимфоцитов, включаемых в анализ, и критерии для регистрации цитогене-

тических нарушений соответствовали общепринятым рекомендациям¹. Расчет индекса репликации проводили по формуле, предоставленной там же:

$$IP = \frac{\% \text{ одноядерных кл.} + 2 \times \% \text{ двуядерных кл.} + 3 \times \% \text{ 3-ядерных кл.} + (4 \times \% \text{ 4-ядерных кл.})}{100}$$

Выделение ДНК проводилось фенол-хлороформным методом. В анализ включены кодирующие ферменты репарации ДНК гены, для которых ранее установлены связи с повреждениями ДНК [Tavares et al., 2020; Liu et al., 2021; Xin et al., 2021] (изучены базы SNPinfo Web Server (<https://snpinfio.niehs.nih.gov>) и RegulomeDB Version 1.1 (<https://regulomedb.org>)). Характеристика (по данным базы National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)) отобранных SNP генов представлена в табл. 2.

Таблица 2

Характеристика выбранных для исследования полиморфных вариантов
[Characteristics of polymorphic variants selected for study]

Ген	SNP	Локализация (GRCh38)	Замена нуклеотидов
<i>APEX1</i>	rs1130409	Chr 14:20456995	T> G
<i>ERCC2</i>	rs13181	Chr 19:45351661	T> G
<i>PARP1</i>	rs1136410	Chr 1:226367601	T> C
<i>hOGG1</i>	rs1052133	Chr 3:9757089	C> G
<i>ERCC5</i>	rs17655	Chr 13:102875652	G> C

Примечание. SNP – однонуклеотидный полиморфизм.

Определение полиморфных вариантов генов *APEX1 rs1130409*, *ERCC2 rs13181*, *PARP1 rs1136410*, *hOGG1 rs1052133* и *ERCC5 rs17655* проводили с использованием наборов реактивов НПФ «Литех» (г. Москва) с последующим разделением продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле. Визуализацию результатов проводили универсальной системой геледокументации Gel Doc (BioRad, США).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения StatSoft Statistica 10.0. Соответствие выборки нормальному распределению проверялось критерием Колмогорова-Смирнова. Исходя из вида распределения, применялись методы непараметрической статистики, в частности U-критерий Манна-Уитни, с целью определения различий между изучаемыми выборками. Критический уровень значимости принимался равным 0.05. Оценка частоты редкого аллеля, соответствие распределения частот равновесию Харди–Вайнберга (χ^2), статистическую значимость различий между группами по частотам аллелей и генотипов для теста χ^2 на гомогенность выборок выполняли при помощи онлайн-ресурса: <https://www.had2know.org/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-2-alleles.html>.

Результаты и обсуждение

Для определения влияния угольной производственной среды на формирование цитогенетических нарушений проведено сравнение показателей микроядерного теста работников угольных теплоэлектростанций с группой неработающих жителей той же области (табл. 3).

Выявлены повышенные частоты ($p < 0.000001$) лимфоцитов с микроядрами, мостами и протрузиями, а также частота клеток на стадии апоптоза у работников угольных теплоэлектростанций по сравнению с контрольными донорами. Однако наблюдается повышенная встречаемость лимфоцитов на этапе клеточного деления ($p < 0.000001$) у жителей Кемеровской обл.

Микроядро представляет собой небольшую хроматин-содержащую структуру, наблюдаемую в клеточной цитоплазме [Fenech, 2007]. Микроядра могут образовываться в результате естественных процессов, таких как метаболизм или старение, или как результат взаимодействия с разнообразными факторами окружающей среды и многими заболеваниями [Sommer, Buraczewska, Kruszewski, 2020].

Формирование цитогенетических нарушений обусловлено несколькими механизмами: 1) отставание хромосомы во время анафазы клеточного деления [Liu, Pellman, 2020]; 2) разрушение хромосом (хромотрипсис) в результате ошибок на стадии митоза и неспособности разрушить оболочку микроядра, содержащего хромосомные фрагменты; 3) локальные нарушения репликации ДНК, приводящие к перестройкам [Hatch, 2018].

Установлено влияние пола ($p < 0.02$) и возраста ($p < 0.01$) работника угольных теплоэлектростанций на накопление цитогенетических нарушений. Статус курения и хронические заболевания не влияют на формирование цитогенетических нарушений у работников угольных теплоэлектростанций ($p > 0.05$). Выявлено влияние стажа работы на угольном производстве ($p < 0.0005$) и профессиональной специализации ($p < 0.009$) на образование геномных нарушений и пролиферативные показатели.

¹ ГОСТ 32635-2014. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Микроядерный тест на клетках млекопитающих in vitro. М.: Стандартинформ, 2019. 14 с.

Таблица 3

Параметры микроядерного теста в изученных группах
[Parameters of the micronucleus test in the studied groups]

Показатель	Рабочие теплоэлектростанций (n = 455)				Группа сравнения (n = 533)			
	Медиана	Мода	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Мода	Нижний квартиль	Верхний квартиль
Частота двухъядерных клеток с цитогенетическими нарушениями (%)								
Микроядра	3.3*	3.6	1.9	4.5	0.6	0.8	0.4	0.9
Мосты	1.5*	0.5	0.8	2.3	0.3	0	0	0.5
Протрузии	2*	0	1.2	3	0.3	0	0	0.5
Пролиферативные показатели (%)								
Ядерность клеток	1	31.2	Мн.	24.6	37.8	32.1	Мн.	25.2
	2	45.8	48.2	40.6	50.8	44.0	43.6	39.6
	3	7	8.4	4.2	9.2	6.2	4.4	4.4
	4	15.2	11.2	10.8	18.6	14.5	17.4	10.4
Митоз	0.6	0.4	0.4	1	2.4*	2.2	1.3	3.0
Апоптоз	1.2*	0.2	0.4	1.8	0.4	0.2	0.2	1.0
Индекс репликации	1.9	Мн.	1.7	2.1	2.0	1.9	1.8	2.1

Примечание. * – отличается от группы сравнения по критерию Манна-Уитни: $*p < 0.000001$.

Частоты встречаемости цитогенетических нарушений в клетках крови в связи с различными полиморфными вариантами генов *APEX1 rs1130409*, *ERCC2 rs13181*, *PARP1 rs1136410*, *hOGG1 rs1052133* и *ERCC5 rs17655* работников угольных теплоэлектростанций представлены в табл. 4.

Таблица 4

Цитогенетические показатели микроядерного теста у рабочих теплоэлектростанций с различными вариантами изученных генов
[Cytogenetic parameters of the micronucleus test in thermal power plant workers with different variants of the studied genes]

Цитогенетические показатели	Медиана	Квартили (25-75%)	Медиана	Квартили (25-75%)	Медиана	Квартили (25-75%)
<i>APEX1 rs1130409</i>						
SNP	TT (n = 138)		TG (n = 234)		GG (n = 83)	
Микроядра	3,3	1,9-4,5	3,6* ¹	2-4,9	3	1,8-3,9
Мосты	1,5	0,8-2,3	1,5	0,8-2,4	1,4	0,7-2,2
Протрузии	2,1	1,1-2,9	1,9	1,1-3,2	2,1* ²	1,5-2,9
<i>ERCC2 rs13181</i>						
SNP	TT (n = 191)		TG (n = 217)		GG (n = 47)	
Микроядра	3,3	1,9-4,5	3,3	2-4,6	3	1,3-4,2
Мосты	1,4	0,9-2,4	1,4	0,9-2,3	1,7* ³	0,8-2,4
Протрузии	2	1,2-2,2	2,1	1,2-2,3	2,3* ³	1,2-3,2
<i>PARP1 rs1136410</i>						
SNP	TT (n = 273)		TC (n = 163)		CC (n = 19)	
Микроядра	3,3	1,9-4,5	3,3	1,9-4,3	3	1,5-4,7
Мосты	1,4	0,8-2,3	1,5	0,7-2,3	1,2	0,9-2,6
Протрузии	2,1	1,3-3	2	1,1-3	1,9	1-3,2
<i>hOGG1 rs1052133</i>						
SNP	CC (n = 245)		CG (n = 180)		GG (n = 30)	
Микроядра	3,5	1,6-4,6	2,9	1,7-4,3	3,7* ⁴	2,2-4,8
Мосты	1,5	0,9-2,5	1,4	0,8-2,2	1,4	0,6-2,4
Протрузии	2	1,1-3,1	2	1,2-3	2,2	1,3-2,9
<i>ERCC5 rs17655</i>						
SNP	GG (n = 279)		GC (n = 149)		CC (n = 27)	
Микроядра	3,3	2-4,5	3,3	1,7-4,6	3,6* ⁵	1,9-4,4
Мосты	1,4	0,8-2,4	1,5	0,8-2,3	1,7* ⁵	0,7-2,8
Протрузии	1,8	1,2-2,8	2	1,1-3,2	1,9	1,5-3

Примечание. ^{*1} TC от TT и GG $p = 0.04$; ^{*2} GG от TT и TG $p = 0.02$; ^{*3} GG от TT и TG $p < 0.01$; ^{*4} GG от CC и GC $p = 0.004$; ^{*5} CC от GG и GC $p < 0.002$.

Установлены повышенные частоты клеток с микроядрами у носителей генотипа TG гена *APEX1* ($p = 0.04$). Также носители полиморфного варианта GG того же гена обладают повышенной частотой лимфоцитов с протрузиями ($p = 0.02$). У обладателей минорного генотипа гена *ERCC2* наблюдаются повышенные частоты встречаемости клеток крови с мостами и протрузиями ($p = 0.01$). Носители минорного генотипа GG гена *hOGG1* обладают повышенной частотой встречаемости клеток с микроядрами ($p < 0.01$). У работников с минорным генотипом CC гена *ERCC5* установлены повышенные показатели клеток с микроядрами и мостами ($p < 0.002$).

Не выявлено статистически значимых отличий между генотипами гена *PARP1 rs1136410* ($p > 0.05$).

Частоты встречаемости цитогенетических нарушений в клетках крови в связи с различными полиморфными вариантами генов *APEX1 rs1130409*, *ERCC2 rs13181*, *PARP1 rs1136410*, *hOGG1 rs1052133*, *ERCC5 rs17655* контрольных доноров представлены в табл. 5.

Таблица 5

Цитогенетические показатели микроядерного теста у индивидов контрольной группы с различными вариантами изученных генов

[Cytogenetic parameters of the micronucleus test in individuals of the control group with different variants of the studied genes]

Цитогенетические показатели	Медиана	Квартили (25-75 %)	Медиана	Квартили (25-75 %)	Медиана	Квартили (25-75 %)
<i>APEX1 rs1130409</i>						
SNP	TT (n = 280)		TG (n = 221)		GG (n = 32)	
Микроядра	0.76	0.5-1.63	0.7	0.58-1.01	0.6	0.6-0.8
Мосты	0.49	0.2-1.13	0.4	0.2-0.8	0.2	0.2-0.4
Протрузии	0.51	0.3-1.4	0.6	0.3-1.7	0.7	0.3-1.5
<i>ERCC2 rs13181</i>						
SNP	TT (n = 272)		TG (n = 225)		GG (n = 36)	
Микроядра	0.7	0.6-1.4	0.8	0.6-1.6	0.5	0.3-0.9
Мосты	0.46	0.2-1.14	0.4	0.2-0.9	0.25	0-0.4
Протрузии	0.5	0.3-1.43	0.5	0.3-1.5	0.35	0-1.2
<i>PARP1 rs1136410</i>						
SNP	TT (n = 311)		TC (n = 192)		CC (n = 30)	
Микроядра	0.8	0.6-1.4	0.7	0.6-0.9	0.5	0.5-0.5
Мосты	0.42	0.2-1.03	0.4	0.2-0.93	0.4	0.1-0.4
Протрузии	0.5	0.3-1.4	0.7	0.2-1.5	1.7*	1.4-2.2
<i>hOGG1 rs1052133</i>						
SNP	CC (n = 325)		CG (n = 185)		GG (n = 23)	
Микроядра	0.6	0.4-0.8	0.6	0.4-0.9	0.5	0.3-0.9
Мосты	0.3	0-0.5	0.4	0-0.5	0.4	0.1-0.5
Протрузии	0.3	0-0.5	0.3	0-0.5	0.5	0.1-0.5
<i>ERCC5 rs17655</i>						
SNP	GG (n = 290)		GC (n = 210)		CC (n = 33)	
Микроядра	0.5	0.3-0.8	0.6	0.3-0.8	0.4	0.2-0.8
Мосты	0.3	0-0.5	0.3	0-0.5	0.4	0-0.5
Протрузии	0.3	0-0.5	0.3	0-0.5	0.4	0-0.6

Примечание. * CC от TT и TC $p = 0.04$.

В группе контроля наблюдается повышенная частота встречаемости клеток с протрузиями у обладателей генотипа CC гена *PARP1* ($p = 0.04$).

В остальных исследуемых случаях в контрольной группе статистически значимых отличий выявлено не было ($p > 0.05$).

Апуриновая/апириமிдиновая эндонуклеаза 1/окислительно-восстановительный эффекторный фактор 1 (*APEX1/Ref-1*) является многофункциональным ферментом, который необходим для поддержания клеточного гомеостаза. *APEX1* является основной апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазой в пути эксцизионной репарации оснований и действует как окислительно-восстановительный регулятор нескольких транскрипционных факторов, включая NF- κ B, AP-1, HIF-1 α и STAT3. Эти функции делают *APEX1* жизненно важным для регуляции клеточного цикла, старения и воспалительных путей. В дополнение к регуляции экспрессии цитокинов и хемокинов путем активации окислительно-восстановительных факторов транскрипции, *APEX1* участвует в других процессах иммунного ответа, включая производство активных форм кислорода. Кроме того, участвуя в активном деметилировании хроматина,

функция *APEX1* заключается в регуляции транскрипции некоторых генов, включая цитокины, такие как TNF α [Oliveira et al., 2022].

Ген АДФ-рибозилтрансферазы (*PARP1*) кодирует хроматин-ассоциированный фермент, поли(АДФ-рибозу) полимеразу-1 (PARP-1), и синтезирует после повреждения ДНК и участвует в целостности генома, регулируя клеточные реакции на повреждение ДНК и апоптоз [Gadad et al., 2021]. Участвует в регуляции различных важных клеточных процессов, таких как дифференцировка, пролиферация и трансформация опухоли, а также в регуляции молекулярных событий, участвующих в восстановлении клетки после повреждения ДНК [Zakharenko et al., 2023].

Пигментная ксеродерма группы D (*ERCC2*) является основным белком, участвующим в NER. Являясь важным геном репарации ДНК, он играет важную роль в белково-опосредованном комплексном NER транскрипционного фактора ПН (TFIIH) и его процессе транскрипции [Wang et al., 2020].

Ген *hOGG1* расположен на хромосоме 3p26.2 и кодирует гликозилазу, катализирующую эксцизию 8-оксогуаниновых аддуктов из поврежденной ДНК. Во многих исследованиях подтверждена связь между полиморфизмом *hOGG1 rs1052133* и риском развития гинекологического рака в европейской популяции [Shi, Xu, Zhang, 2020]. Полиморфизм *hOGG1 rs1052133*, наиболее изученный полиморфизм *hOGG1*, влияет на активность белка и, таким образом, способствует канцерогенезу [Zhang et al., 2017].

XPG, также называемая *ERCC5*, является основной эндонуклеазой DDR, дефицит которой приводит к серьезным дефектам развития, прогерии и раку. Он в основном известен своей ролью в вырезании повреждений ДНК в эксцизионной репарации нуклеотидов (NER), но в последние годы было обнаружено, что он функционирует и в других механизмах поддержания генома. *ERCC5* входит в семейство структурно-специфических нуклеаз *XPG/RAD2*, которое у млекопитающих также включает *FEN1*, *GEN1* и *EXO1* и выполняет важные функции поддержания генома. Наследственные мутации гена *ERCC5* связаны с несколькими заболеваниями человека, характеризующимися широким спектром симптомов, включая предрасположенность к раку, прогрессирующую нейродегенерацию и нарушение развития [Muniesa-Vargas et al., 2022]. Некоторые мутации *ERCC5* вызывают пигментную ксеродерму (XP), которая характеризуется фоточувствительностью, аномальной пигментацией кожи, повышенным риском развития рака и иногда неврологическими заболеваниями [Rizza et al., 2021].

Важность репарации ДНК для поддержания целостности генома и предотвращения развития опухолей подчеркивается тем фактом, что дефекты в репарации ДНК связаны с повышенной восприимчивостью клеток к токсическим, мутагенным и канцерогенным эффектам воздействия окружающей среды [Huang, Zhou, 2021].

Важность удаления продуктов окисления ДНК отражается в избыточности ферментов репарации ДНК для этих поражений. Из-за этой избыточности определение роли АФК в развитии рака и ферментов репарации в его предотвращении является сложной задачей. Однако вмешательство окружающей среды в восстановление таких повреждений может способствовать развитию рака [Langie et al., 2015].

Одним из примеров связи между индукцией АФК и развитием рака является повышенная заболеваемость раком легких, кожи, мочевого пузыря и печени у людей, которые подвергались воздействию агента, индуцирующего АФК, мышьяка [Wang et al., 2012]. Кроме того, было показано, что оксид азота ингибирует ферменты репарации ДНК [Khan et al., 2020]. Также сообщалось, что репарация нуклеотидов может быть ингибирована окислительным стрессом [Van Houten, Santa-Gonzalez, Camargo, 2018].

Генетическая изменчивость в генах репарации ДНК может модулировать восприимчивость к повреждению ДНК [Angelini et al., 2012]. В связи с этим в работе проведена оценка влияния полиморфизмов генов репарации ДНК *APEX1*, *ERCC2*, *PARP1*, *hOGG1*, *ERCC5* на формирование микроядер, мостов и протрузий, выявляемых при помощи микроядерного теста.

В работе [Angelini et al., 2005] изучена частота микроядер в группе, подвергшейся воздействию низких уровней ионизирующего излучения, и в соответствующей контрольной группе. Как в исследуемой выборке, так и в контрольной группе также оценивалось возможное влияние однонуклеотидных полиморфизмов генов *XRCC1*, *XRCC3* и *ERCC2* на частоту микроядер. Также было рассмотрено влияние статуса курения, возраста и пола. Авторами установлены повышенные частоты подвергшихся воздействию работников, обладающих аллелем дикого типа гена *ERCC2*, чем группа сравнения. Статус курения статистически значимо не влиял на частоту встречаемости микроядер в обеих группах. Однако увеличение возраста связано с повышением частоты клеток с микроядрами у работников. Также при объединении обеих групп исследования у женщин наблюдались повышенные частоты лимфоцитов с микроядрами.

У рабочих-носителей генотипа CG гена *hOGG1* выявлена повышенная чувствительность к хромосомным повреждениям, выраженная в увеличенном формировании микроядер.

В исследовании [Qiu et al., 2011] рассматривалась взаимосвязь между генетическим полиморфизмом семи генов системы репарации ДНК (*XPA*, *ERCC2*, *XPC*, *ERCC5*, *XPF*, *ERCC1* и *APEX1*) и восприимчивостью к хромосомному повреждению после воздействия винилхлорида. Было исследовано сто восемьдесят рабочих, подвергшихся профессиональному воздействию, и 43 контрольных донора, не подвергшихся

ся воздействию. У работников с вариантом минорного генотипа *ERCC2* частота микроядер была незначительно выше ($p = 0.07$).

Sinitsky M.Y. с соавт. [2015] изучал влияние полиморфных вариантов генов системы репарации на частоту микроядер у детей, проживающих в школе-интернате г. Таштагол (Кемеровская обл., Россия). Выявлено достоверное увеличение частоты двуядерных лимфоцитов с микроядрами у носителей полиморфизма генотипа CC гена *ERCC5* по сравнению с гетерозиготными и гомозиготными носителями. Кроме того, генотип CC гена *ADPRT* ассоциировался с повышенной частотой двуядерных лимфоцитов с нуклеоплазматическими мостами.

Этим же коллективом [Sinitsky et al., 2017] установлена повышенная частота двуядерных лимфоцитов с микроядрами у шахтеров с генотипом GG гена *hOGG1 rs1052133* по сравнению с носителями генотипа CC.

В исследовании [Angelini et al., 2012] оценено влияние полиморфизмов генов репарации ДНК (*APEX1*, *hOGG1*, *NBS1*, *ERCC2*, *XRCC1* и *XRCC3*) на формирование микроядер как биомаркера ранних биологических эффектов при контакте с бензолом. Значительно более высокая частота микроядер была зарегистрирована у регулировщиков дорожного движения, чем в контрольной группе.

Cheng J с соавт. [2007] изучали ассоциации между несколькими генетическими полиморфизмами генов эксцизионной репарации нуклеотидов (*ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC4*, *ERCC5* и *ERCC6*) и уровнем повреждения хромосом у 140 коксохимических рабочих, подвергшихся воздействию высокого уровня полиароматических углеводородов (ПАУ), и у 66 доноров, не подвергавшихся воздействию. Анализ показал значительную связь между полиморфизмом *ERCC2 G23591A* и частотами параметров микроядерного теста среди пожилых рабочих коксовых печей. Результаты показывают, что полиморфизмы *ERCC1 C19007T*, *ERCC6 A3368G* и *ERCC2 G23591A* связаны с частотами показателей микроядерного теста среди коксовых рабочих.

Заключение

В работе подтверждено влияние производственной среды угольных теплоэлектростанций на формирование повреждений ДНК в виде повышенных частот микроядер, мостов и протрузий в клетках крови работников.

Установлены ассоциации минорного варианта *ERCC2 rs13181* с повышенной частотой нуклеоплазменных мостов и протрузий, минорного варианта *ERCC5 rs17655* с увеличением формирования микроядер и нуклеоплазменных мостов, гетерозиготного варианта гена *APEX1 rs1130409* с повышенной частотой микроядер, минорного генотипа этого же гена с частотой клеток с протрузиями, минорного генотипа *hOGG1 rs1052133* с микроядрами при воздействии на организм работников промышленной среды угольных теплоэлектростанций. Обладатели данных генотипических вариантов должны стать приоритетной группой при проведении профилактических мероприятий. Полученные результаты свидетельствуют о значимом вкладе генетических и средовых факторов в формирование генотоксических эффектов у работников угольных теплоэлектростанций.

Список источников

1. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Ч. 2. Факторы среды и индивидуальные особенности в системе нестабильности генома человека. Дополнительные возможности теста. Методика проведения экспериментов и цитогенетического анализа // Экологическая генетика. 2006. Т. 4, № 4. С. 38–54.
2. Angelini S. et al. Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes // Mutat. Res. 2005. Vol. 570, № 1. P. 105–117. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.10.007.
3. Angelini S. et al. Environmental exposure to benzene, micronucleus formation and polymorphisms in DNA-repair genes: a pilot study // Mutat. Res. 2012. Vol. 743, № 1–2. P. 99–104. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.10.018.
4. Balali-Mood M. et al. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic // Front Pharmacol. 2021. Vol. 12. Art. 643972. DOI: 10.3389/fphar.2021.643972.
5. Cheng J. et al. Association between nucleotide excision repair gene polymorphisms and chromosomal damage in coke-oven workers // Biomarkers. 2007. Vol. 12, № 1. P. 76–86. DOI: 10.1080/13547500600950168.
6. Corvi R., Madia F. In vitro genotoxicity testing-Can the performance be enhanced? // Food Chem. Toxicol. 2017. Vol. 106(Pt B). P. 600–608. DOI: 10.1016/j.fct.2016.08.024.
7. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay // Nat. Protoc. 2007. Vol. 2, № 5. P. 1084–1104. DOI: 10.1038/nprot.2007.77.
8. Fenech M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability // Genes. 2020. Vol. 11, № 10. Art. 1203. DOI: 10.3390/genes11101203.

9. Ferragut Cardoso A.P. et al. miRNA dysregulation is an emerging modulator of genomic instability // *Semin. Cancer Biol.* 2021. Vol. 76. P. 120–131. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.05.004.
10. Gadad S.S. et al. PARP-1 Regulates Estrogen-Dependent Gene Expression in Estrogen Receptor α -Positive Breast Cancer Cells // *Mol. Cancer Res.* 2021. Vol. 19, № 10. P. 1688–1698. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-21-0103.
11. Hatch E.M. Nuclear envelope rupture: little holes, big openings // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2018. Vol. 52. P. 66–72. DOI: 10.1016/j.ceb.2018.02.001.
12. Hossain M.N., Paul S.K., Hasan M.M. Environmental impacts of coal mine and thermal power plant to the surroundings of Barapukuria, Dinajpur, Bangladesh // *Environ. Monit. Assess.* 2015. Vol. 187, № 4. Art. 202. DOI: 10.1007/s10661-015-4435-4.
13. Huang R., Zhou P.K. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy // *Signal Transduct. Target Ther.* 2021. Vol. 6, № 1. Art. 254. DOI: 10.1038/s41392-021-00648-7.
14. Khan F.H. et al. The Role of Nitric Oxide in Cancer: Master Regulator or NOT? // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 24. Art. 9393. DOI: 10.3390/ijms21249393.
15. Labzovskii L.D., Belikov D.A., Damiani A. Spaceborne NO₂ observations are sensitive to coal mining and processing in the largest coal basin of Russia // *Sci Rep.* 2022. Vol. 12, № 1. Art. 12597. DOI: 10.1038/s41598-022-16850-8.
16. Langie S.A. et al. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society // *Carcinogenesis.* 2015. Vol. 36, № 1. P. 61–88. DOI: 10.1093/carcin/bgv031.
17. Liu J. et al. Association between APEX1 rs1760944 and rs1130409 polymorphism with prostate cancer risk: A systematic review and meta-analysis // *Medicine (Baltimore).* 2021. Vol. 100, № 46. Art. e27630. DOI: 10.1097/MD.00000000000027630.
18. Liu S., Pellman D. The coordination of nuclear envelope assembly and chromosome segregation in metazoans // *Nucleus.* 2020. Vol. 11. P. 35–52. DOI: 10.1080/19491034.2020.1742064.
19. López-Gil L., Pascual-Ahuir A., Proft M. Genomic Instability and Epigenetic Changes during Aging // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, № 18. Art. 14279. DOI: 10.3390/ijms241814279.
20. Munawer M.E. Human health and environmental impacts of coal combustion and post-combustion wastes // *Journal of Sustainable Mining.* 2018. Vol. 17, № 2. P. 87–96. DOI: 10.1016/j.jsm.2017.12.007.
21. Muniesa-Vargas A. et al. XPG: a multitasking genome caretaker // *Cell Mol. Life Sci.* 2022. Vol. 79, № 3. Art. 166. DOI: 10.1007/s00018-022-04194-5.
22. Nagel Z.D., Chaim I.A., Samson L.D. Inter-individual variation in DNA repair capacity: a need for multi-pathway functional assays to promote translational DNA repair research // *DNA Repair (Amst).* 2014. Vol. 19. Art. 199–213. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.03.009.
23. Oliveira T.T. et al. APEX1/Ref-1 Role in Inflammation and Immune Response // *Front Immunol.* 2022. Vol. 13. Art. 793096. DOI: 10.3389/fimmu.2022.793096.
24. Qiu Y.L. et al. DNA repair gene polymorphisms and micronucleus frequencies in Chinese workers exposed to vinyl chloride monomer // *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2011. Vol. 214, № 3. P. 225–230. DOI: 10.1016/j.ijheh.2010.12.001.
25. Rizza E.R.H. et al. Xeroderma Pigmentosum: A Model for Human Premature Aging // *J. Invest. Dermatol.* 2021. Vol. 141, № 4S. P. 976–984. DOI: 10.1016/j.jid.2020.11.012.
26. Sarker S.K. et al. Effect of Barapukuria coal mine on soil environment // *Journal of Agro for Environment.* 2010a. Vol. 4, № 2. P. 181–183.
27. Sarker S.K. et al. Effect of Barapukuria power plant on environment // *Journal of Agro for Environment.* 2010b. Vol. 4, № 2. P. 125–127.
28. Shi Y., Xu W., Zhang X. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with gynecologic cancer susceptibility: a meta-analysis // *Biosci. Rep.* 2020. Vol. 40, № 12. Art. BSR20203245. DOI: 10.1042/BSR20203245.
29. Sinitsky M.Y. et al. Association of DNA repair gene polymorphisms with genotoxic stress in underground coal miners // *Mutagenesis.* 2017. Vol. 32, № 5. P. 501–509. DOI: 10.1093/mutage/gex018.
30. Sinitsky M.Y. et al. Associations of DNA-repair gene polymorphisms with a genetic susceptibility to ionizing radiation in residents of areas with high radon (²²²Rn) concentration // *Int. J. Radiat. Biol.* 2015. Vol. 9, № 6. P. 486–494. DOI: 10.3109/09553002.2015.1012306.
31. Sommer S., Buraczewska I., Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 4. Art. 1534. DOI: 10.3390/ijms21041534.
32. Tavares C.B. et al. Association between Single Nucleotide Polymorphisms and Glioma Risk: A Systematic Literature Review // *Cancer Invest.* 2020. Vol. 38, № 3. P. 169–183. DOI: 10.1080/07357907.2020.1719502.
33. Van Houten B., Santa-Gonzalez G.A., Camargo M. DNA repair after oxidative stress: current challenges // *Curr. Opin. Toxicol.* 2018. Vol. 7. P. 9–16. DOI: 10.1016/j.cotox.2017.10.009.

34. Vral A., Fenech M., Thierens H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure // *Mutagenesis*. 2011. Vol. 26, № 1. P. 11–17. DOI: 10.1093/mutage/geq078.
35. Wang T.S. et al. Lymphocyte-based challenge DNA-repair assays for personalized health risk assessment // *Mutat. Res. Rev.* 2022. Vol. 790. Art. 108427. DOI: 10.1016/j.mrrev.2022.108427.
36. Wang X. et al. Arsenic and chromium in drinking water promote tumorigenesis in a mouse colitis-associated colorectal cancer model and the potential mechanism is ROS-mediated Wnt/ β -catenin signaling pathway // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012. Vol. 262, № 1. P. 11–21. DOI: 10.1016/j.taap.2012.04.014.
37. Wang Y. et al. Cloning of the ERCC2 gene and its function in malignant melanoma cells // *Oncol. Lett.* 2020. Vol. 20, № 2. P. 1803–1809. DOI: 10.3892/ol.2020.11708.
38. Xin Y. et al. PARP1 rs1136410 Val762Ala contributes to an increased risk of overall cancer in the East Asian population: a meta-analysis // *J. Int. Med. Res.* 2021. Vol. 49, № 3. Art. 300060521992956. DOI: 10.1177/0300060521992956.
39. Zakharenko A.L. et al. PARP1 Gene Knockout Suppresses Expression of DNA Base Excision Repair Genes // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2023. Vol. 508, № 1. P. 6–11. DOI: 10.1134/S1607672922700028.
40. Zhang D. et al. Association between hOGG1 polymorphism rs1052133 and gastric cancer // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 21. P. 34321–34329. DOI: 10.18632/oncotarget.16124.

References

1. Ingel F.I. [Perspectives of micronuclear test in human lymphocytes cultivated in cytogenetic block conditions. Part 2. Environmental factors and individual features in system of evaluation of human genome instability. Additional capability of the test. The technique for cytogenetic analysis]. *Ėkologiĉeskaja genetika*. V. 4, No. 4 (2006): pp. 38-54. (In Russ.).
2. Angelini S., Kumar R., Carbone F., Maffei F., Forti G.C., Violante F.S., Lodi V., Curti S., Hemminki K., Hrelia P. Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes. *Mutat. Res.* V. 570, No. 1 (2005): pp. 105-117. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.10.007.
3. Angelini S., Maffei F., Bermejo J.L., Ravegnini G., L'insalata D., Cantelli-Forti G., Violante F.S., Hrelia P. Environmental exposure to benzene, micronucleus formation and polymorphisms in DNA-repair genes: a pilot study. *Mutat Res.* V. 743, No. 1-2 (2012): pp. 99-104. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.10.018.
4. Balali-Mood M., Naseri K., Tahergorabi Z., Khazdair M.R., Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Front Pharmacol.* V. 12 (2021). Art. 643972. DOI: 10.3389/fphar.2021.643972.
5. Cheng J., Leng S., Dai Y., Huang C., Pan Z., Niu Y., Li B., Zheng Y. Association between nucleotide excision repair gene polymorphisms and chromosomal damage in coke-oven workers. *Biomarkers*. V. 12, No. 1 (2007): pp. 76-86. DOI: 10.1080/13547500600950168.
6. Corvi R., Madia F. In vitro genotoxicity testing-Can the performance be enhanced? *Food Chem. Toxicol.* V. 106(Pt B) (2017): pp. 600-608. DOI: 10.1016/j.fct.2016.08.024.
7. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* V. 2, No 5 (2007): pp. 1084-1104. DOI: 10.1038/nprot.2007.77.
8. Fenech M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes*. V. 11, No. 10 (2020). Art. 1203. DOI: 10.3390/genes11101203.
9. Ferragut Cardoso A.P., Banerjee M., Nail A.N., Lykoudi A., States J.C. miRNA dysregulation is an emerging modulator of genomic instability. *Semin. Cancer Biol.* V. 76 (2021): pp. 120-131. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.05.004.
10. Gadad S.S., Camacho C.V., Malladi V., Hutti C.R., Nagari A., Kraus W.L. PARP-1 Regulates Estrogen-Dependent Gene Expression in Estrogen Receptor α -Positive Breast Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* V. 19, No. 10 (2021): pp. 1688-1698. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-21-0103.
11. Hatch E.M. Nuclear envelope rupture: little holes, big openings. *Curr. Opin. Cell Biol.* V. 52 (2018): pp. 66-72. DOI: 10.1016/j.ceb.2018.02.001.
12. Hossain M.N., Paul S.K., Hasan M.M. Environmental impacts of coal mine and thermal power plant to the surroundings of Barapukuria, Dinajpur, Bangladesh. *Environ. Monit. Assess.* V. 187, No. 4 (2015). Art. 202. DOI: 10.1007/s10661-015-4435-4.
13. Huang R., Zhou P.K. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. *Signal Transduct. Target Ther.* V. 6, No. 1 (2021). Art. 254. DOI: 10.1038/s41392-021-00648-7.
14. Khan F.H., Dervan E., Bhattacharyya D.D., McAuliffe J.D., Miranda K.M., Glynn S.A. The Role of Nitric Oxide in Cancer: Master Regulator or NOt? *Int. J. Mol. Sci.* V. 21, No. 24 (2020). Art. 9393. DOI: 10.3390/ijms21249393.

15. Labzovskii L.D., Belikov D.A., Damiani A. Spaceborne NO₂ observations are sensitive to coal mining and processing in the largest coal basin of Russia. *Sci. Rep.* V. 12, No. 1 (2022). Art. 12597. DOI: 10.1038/s41598-022-16850-8.
16. Langie S.A., Koppen G., Desaulniers D., Al-Mulla F., Al-Temaimi R., Amedei A. et al. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis*. V. 36, No. 1 (2015): pp. 61-88. DOI: 10.1093/carcin/bgv031.
17. Liu J., Zheng J., Guo Y., Sheng X., Yin Y., Qian S., Xu B., Xiong W., Yin X. Association between APEX1 rs1760944 and rs1130409 polymorphism with prostate cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Medicine* (Baltimore). V. 100, No. 46 (2021). Art. e27630. DOI: 10.1097/MD.00000000000027630.
18. Liu S., Pellman D. The coordination of nuclear envelope assembly and chromosome segregation in metazoans. *Nucleus*. V. 11 (2020): pp. 35-52. DOI: 10.1080/19491034.2020.1742064.
19. López-Gil L., Pascual-Ahuir A., Proft M. Genomic Instability and Epigenetic Changes during Aging. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24, No. 18 (2023). Art. 14279. DOI: 10.3390/ijms241814279.
20. Munawer M.E. Human health and environmental impacts of coal combustion and post-combustion wastes. *Journal of Sustainable Mining*. V. 17, No. 2 (2018): pp. 87-96. DOI: 10.1016/j.jsm.2017.12.007.
21. Muniesa-Vargas A., Theil A.F., Ribeiro-Silva C., Vermeulen W., Lans H. XPG: a multitasking genome caretaker. *Cell Mol. Life Sci.* V. 79, No 3 (2022). Art. 166. DOI: 10.1007/s00018-022-04194-5.
22. Nagel Z.D., Chaim I.A., Samson L.D. Inter-individual variation in DNA repair capacity: a need for multi-pathway functional assays to promote translational DNA repair research. *DNA Repair* (Amst). V. 19 (2014): pp. 199-213. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.03.009.
23. Oliveira T.T., Coutinho L.G., de Oliveira L.O.A., Timoteo A.R.S., Farias G.C., Agnez-Lima L.F. APEX1/Ref-1 Role in Inflammation and Immune Response. *Front Immunol.* V. 13 (2022). Art. 793096. DOI: 10.3389/fimmu.2022.793096.
24. Qiu Y.L., Wang W., Wang T., Sun P., Wu F., Zhu S.M., Qian J., Jin L., Au W., Xia Z.L. DNA repair gene polymorphisms and micronucleus frequencies in Chinese workers exposed to vinyl chloride monomer. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. V. 214, No. 3 (2011): pp. 225-230. DOI: 10.1016/j.ijheh.2010.12.001.
25. Rizza E.R.H., DiGiovanna J.J., Khan S.G., Tamura D., Jeskey J.D., Kraemer K.H. Xeroderma Pigmentosum: A Model for Human Premature Aging. *J. Invest. Dermatol.* V. 141, No. 4S (2021): pp. 976-984. DOI: 10.1016/j.jid.2020.11.012.
26. Sarker S.K., Baten M.A., Haque M.E., Hossain M.S., Rahman, S.M.M. Effect of Barapukuria coal mine on soil environment. *Journal of Agro for Environment*. V. 4, No. 2 (2010a): pp. 181-183.
27. Sarker S.K., Baten M.A., Haque M.E., Islam M.R., Nasrin M. Effect of Barapukuria power plant on environment. *Journal of Agro for Environment*. V. 4, No. 2 (2010b): pp. 125-127.
28. Shi Y., Xu W., Zhang X. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with gynecologic cancer susceptibility: a meta-analysis. *Biosci. Rep.* V. 40, No. 12 (2020). Art. BSR20203245. DOI: 10.1042/BSR20203245.
29. Sinitsky M.Y., Minina V.I., Asanov M.A., Yuzhalin A.E., Ponasenko A.V., Druzhinin V.G. Association of DNA repair gene polymorphisms with genotoxic stress in underground coal miners. *Mutagenesis*. V. 32, No. 5 (2017): pp. 501-509. DOI: 10.1093/mutage/gex018.
30. Sinitsky M.Y., Larionov A.V., Asanov M.A., Druzhinin V.G. Associations of DNA-repair gene polymorphisms with a genetic susceptibility to ionizing radiation in residents of areas with high radon (²²²Rn) concentration. *Int. J. Radiat. Biol.* V. 91, No. 6 (2015): pp. 486-494. DOI: 10.3109/09553002.2015.1012306.
31. Sommer S., Buraczewska I., Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21, No. 4 (2020). Art. 1534. DOI: 10.3390/ijms21041534.
32. Tavares C.B., Gomes-Braga F.D.C.S.A., Sousa E.B., Brito J.N.P.O., Melo M.A., Campelo V. et al. Association between Single Nucleotide Polymorphisms and Glioma Risk: A Systematic Literature Review. *Cancer Invest.* V. 38, No. 3 (2020): pp. 169-183. DOI: 10.1080/07357907.2020.1719502.
33. Van Houten B., Santa-Gonzalez G.A., Camargo M. DNA repair after oxidative stress: current challenges. *Curr. Opin. Toxicol.* V. 7 (2018): pp. 9-16. DOI: 10.1016/j.cotox.2017.10.009.
34. Vral A., Fenech M., Thierens H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*. V. 26, No. 1 (2011): pp. 11-17. DOI: 10.1093/mutage/geq078.
35. Wang T.S., Ruchirawat M., Narasumrit P., Xia Z.L., Au W.W. Lymphocyte-based challenge DNA-repair assays for personalized health risk assessment. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* V. 790 (2022). Art. 108427. DOI: 10.1016/j.mrrev.2022.108427.
36. Wang X., Mandal A.K., Saito H., Pulliam J.F., Lee E.Y., Ke Z.J. et al. Arsenic and chromium in drinking water promote tumorigenesis in a mouse colitis-associated colorectal cancer model and the potential mechanism is ROS-mediated Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V. 262, No. 1 (2012): pp. 11-21. DOI: 10.1016/j.taap.2012.04.014.
37. Wang Y., Zhou Y., Wang Y., Peng C., Gao M. Cloning of the ERCC2 gene and its function in malignant melanoma cells. *Oncol. Lett.* V. 20, No. 2 (2020): pp. 1803-1809. DOI: 10.3892/ol.2020.11708.

38. Xin Y., Yang L., Su M., Cheng X., Zhu L., Liu J. PARP1 rs1136410 Val762Ala contributes to an increased risk of overall cancer in the East Asian population: a meta-analysis. *J. Int. Med. Res.* V. 49, No. 3 (2021). Art. 300060521992956. DOI: 10.1177/0300060521992956.

39. Zakharenko A.L., Malakhova A.A., Dyrkheeva N.S., Okorokova L.S., Medvedev S.P., Zakian S.M. et al. PARP1 Gene Knockout Suppresses Expression of DNA Base Excision Repair Genes. *Dokl. Biochem. Biophys.* V. 508, No. 1 (2023): pp. 6-11. DOI: 10.1134/S1607672922700028.

40. Zhang D., Guo X., Hu J., Zeng G., Huang M., Qi D., Gong B. Association between hOGG1 polymorphism rs1052133 and gastric cancer. *Oncotarget.* V. 8, No. 21 (2017): pp. 34321-34329. DOI: 10.18632/oncotarget.16124.

Статья поступила в редакцию 24.07.2024; одобрена после рецензирования 19.09.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 24.07.2024; approved after reviewing 19.09.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторах

Анна Владимировна Марущак – marushchak.av@mail.ru, аспирант, инженер-технолог лаборатории цитогенетики; Анастасия Владимировна Торгунакова – kotia1490@mail.ru, ведущий инженер-технолог лаборатории цитогенетики, ведущий инженер-технолог кафедры генетики и фундаментальной медицины; Руслан Александрович Титов – ruslan-tito00@rambler.ru, ведущий инженер-технолог лаборатории цитогенетики, ведущий инженер-технолог кафедры генетики и фундаментальной медицины; Ольга Александровна Соболева – ведущий инженер-технолог лаборатории цитогенетики; Варвара Ивановна Минина – vminina@mail.ru, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории цитогенетики, заведующий кафедры генетики и фундаментальной медицины.

Information about the authors

Anna V. Marushchak – marushchak.av@mail.ru, postgraduate student, process engineer, laboratory of cytogenetics; Anastasia V. Torgunakova – kotia1490@mail.ru, leading process engineer, laboratory of cytogenetics, leading engineer of the Department of Genetics and Basic Medicine; Ruslan A. Titov – ruslan-tito00@rambler.ru, leading process engineer, laboratory of cytogenetics, leading engineer of the Department of Genetics and Basic Medicine; Olga A. Soboleva – leading process engineer, laboratory of cytogenetics; Varvara I. Minina – vminina@mail.ru, doctor of biological sciences, chief researcher of the laboratory of cytogenetics, head of the department of genetics and basic medicine.

Вклад авторов:

Марущак А. В. – концепция исследования; сбор материалов; лабораторный анализ; статистическая обработка материала; написание исходного текста; итоговые выводы.
Торгунакова А. В. – сбор материалов; лабораторный анализ.
Титов Р. А. – сбор материалов; лабораторный анализ.
Соболева О. А. – сбор материалов; лабораторный анализ.
Минина В. И. – научное руководство; итоговые выводы; доработка текста.

Contribution of the authors:

Marushchak A. V. – research concept; collection of materials; laboratory analysis; statistical processing of material; writing the original text; final conclusions.
Torgunakova A. V. – collection of materials; laboratory analysis.
Titov R. A. – collection of materials; laboratory analysis.
Soboleva O. A. – collection of materials; laboratory analysis.
Minina V. I. – research supervision; final conclusions; text revision.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

ГЕНЕТИКА

Научная статья

УДК 575.22:577.29

EDN SVKBNX

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-433-439



**Молекулярно-генетический анализ гена *CYP11B2*,
ассоциированного с развитием артериальной гипертензии
у дзюдоистов города Перми**

Анна Владимировна Сорокина^{1, 2✉}

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

^{2✉} Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь, Россия, vostanyuta@mail.ru

Аннотация. Для корректировки тренировочного процесса важно знать предрасположенность единоборцев к развитию физических качеств, а также сердечно-сосудистых заболеваний, например, артериальной гипертензии. Цель данного исследования – изучение связи полиморфизма гена *CYP11B2* (англ. cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2) с развитием артериальной гипертензии у дзюдоистов школы «Витязь» г. Перми. Выборка для исследований включала 147 человек, распределенных на две группы: Группу I, включающую единоборцев с нормальным давлением, и Группу II, которую составили спортсмены с артериальной гипертензией. У испытуемых в возрасте от 10 до 16 лет проведены исследования с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) и выявлен полиморфизм Т/С гена *CYP11B2* (rs1799998). Корреляционный анализ Спирмена выявил наличие положительной связи ($r_s=0.597$) между показателями генотипа Т/Т гена *CYP11B2* у испытуемых и наличием артериальной гипертензии. Данные генетического анализа необходимы в процессе подготовки единоборцев в спортивных школах, т.к. на их основе можно составлять индивидуальные программы тренировок с учетом генотипа и особенностей физической подготовки конкретного спортсмена.

Ключевые слова: полиморфизм гена *CYP11B2*, артериальная гипертензия, дзюдоисты

Для цитирования: Сорокина А. В. Молекулярно-генетический анализ гена *CYP11B2*, ассоциированного с развитием артериальной гипертензии у дзюдоистов города Перми // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 433–439. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-433-439>.

Благодарности: автор выражает благодарность тренеру Рафису Мирзаяновичу Закирову и ученикам из спортивной школы олимпийского резерва по самбо и дзюдо «Витязь» им. И.И. Пономарева г. Перми, принявшим участие в исследовании.

GENETICS

Original article

**Molecular genetic analysis of the *CYP11B2* gene associated with
the development of arterial hypertension in judokas from Perm**

Anna V. Sorokina^{1, 2✉}

¹ Perm State University, Perm, Russia

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

Abstract. To adjust the training process, it is important to know the predisposition of martial artists to the development of physical qualities, as well as the predisposition to the development of cardiovascular diseases, such as arterial hypertension. The purpose of this research is to study the relationship between the *CYP11B2* gene polymorphism (cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2) and the development of arterial hypertension in judokas of the «Vityaz school» in Perm. The research sample included 147 people divided into two groups: Group I, including martial artists with normal blood pressure, and Group II, which consisted of athletes with arterial hypertension. In subjects aged 10 to 16 years, studies were conducted using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and T/C polymorphism of the *CYP11B2* gene (rs1799998) was detected. Spearman correlation analysis revealed a positive relationship ($r_s=0.597$) between the T/T genotype values of the *CYP11B2* gene in the subjects and the presence of arterial hypertension. Genetic analysis data are necessary in the process of training martial artists in sports schools, since they can be used to create individual training programs taking into account the genotype and physical fitness characteristics of a particular athlete.

Keywords: gene polymorphism *CYP11B2*, arterial hypertension, judokas

For citation: Sorokina A. V. [Molecular genetic analysis of the *CYP11B2* gene associated with the development of arterial hypertension in judokas from Perm]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2024): pp. 433-439. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-433-439>.

Acknowledgments: the author expresses gratitude to the coach Rafis M. Zakirov and the students from the sports school of the Olympic reserve in sambo and judo "Vityaz" named after I.I. Ponomarev in the city of Perm, who took part in the study.

Введение

В ходе каждой спортивной игры у спортсмена возможна работа любой мощности, поэтому тренировка должна быть направлена на развитие у единоборцев высокого уровня аэробной и анаэробной производительности. Большие энергетические затраты, высокая частота пульса, потеря веса свидетельствуют о высоких требованиях к организму спортсмена. У них наблюдается повышенная емкость легких, брадикардия, умеренная гипертрофия сердца, увеличение содержания гемоглобина в крови [Гурович, Иванова, 1977]. Все это показывает важность изучения генетической компоненты успешности спортсменов. Для сохранения их здоровья и корректировки тренировочного процесса важно знать предрасположенность единоборца к развитию физических качеств, а также предрасположенность к развитию заболеваний, например, артериальной гипертензии.

Артериальная гипертензия – это стойкое повышение артериального давления, в случае чего систолическое больше 140 мм рт.ст. и/или диастолическое выше 90 мм рт. ст. [Баранов, 2009]. Повышенное артериальное давление чаще регистрируется у мальчиков, чем у девочек. Распространенность гипертензии у детей и подростков составляет около 17% [Образцова и др., 2005]. Распространенность артериальной гипертензии у спортсменов такая же, как в общей популяции [Смоленский, Михайлова, 2017]. К факторам риска гипертензии можно отнести особенности тренировочного процесса, высокие нагрузки, большое потребление нестероидных противовоспалительных препаратов, стероидов и стимуляторов, высокий уровень стресса, а также гипертонию в семейном анамнезе [Lehmann, Keul, 1984; Longás, Casanovas, 1996; Izzo, 2009].

Артериальная гипертензия сопровождается развитием гипертрофии, увеличением жесткости миокарда, развитием диастолической дисфункции левого желудочка [Овечкин и др., 2000; Кобалава и др., 2017]. Также наряду с артериальной гипертензией повышается активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы [Querejeta et al., 2004; Dzeshka et al., 2017]. Если эти изменения возникают на фоне генетической предрасположенности, то может возникнуть фибрилляция предсердий [Dzeshka et al., 2017].

К факторам риска развития фибрилляции предсердий у пациентов с метаболическим синдромом, наряду с артериальной гипертензией, относится высокое содержание циркулирующих в крови профиброгенных субстанций – альдостерона и трансформирующего фактора роста-бета1 [Зеленская и др., 2016]. Ген *CYP11B2* (англ. cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2) кодирует 11/18-β-гидроксилазу – фермент, который участвует в синтезе альдостерона в клетках клубочковой зоны коры надпочечников. Альдостерон способствует повышению содержания в организме натрия и внеклеточной жидкости. В то же время альдостерон повышает чувствительность гладких мышц сосудов к сосудосуживающим веществам. Полиморфная замена в регуляторной зоне -344C>T приводит к увеличению уровня альдостерона за счет повышения экспрессии гена [Jia et al., 2013]. По литературным данным, наличие аллеля T несет в себе риск развития артериальной гипертензии. У людей с генотипом -344TT может иметь место высокий уровень альдостерона и более высокое артериальное давление при повышенном уровне потребления поваренной соли [Andersen, 2013]. Было показано, что у носителей -344T-аллеля чаще отмечалась большая экскреция альдостерона, а также у них определялось повышенное артериальное давление, чем C/C-гомозиготы [Brand et al., 1998; Davies et al., 1999; Yu et al., 2015]. Несмотря на множество исследований данного гена, его значение как гена-маркера артериальной гипертензии у дзюдоистов практически не изучено.

Цель работы – изучение связи полиморфизма гена *CYP11B2* с развитием артериальной гипертензии у дзюдоистов школы «Витязь» г. Перми.

Материал и методы исследования

Выборка для исследований включала 147 испытуемых из спортивной школы олимпийского резерва по самбо и дзюдо «Витязь» им. И.И. Пономарева г. Перми. Возраст испытуемых варьировал от 10 до 16 лет. Среди них было 130 единоборцев мужского и 17 женского пола. Единоборства являются преимущественно мужскими видами спорта, а потому в выборках преобладают лица мужского пола [Вострикова, Боронникова, Закиров, 2020].

Забор биологического материала (буккального эпителия) для генетического анализа проводили с помощью соскоба эпителиальных клеток ротовой полости. От каждого испытуемого было получено добровольное согласие на забор биологического материала. Измерение артериального давления проводили по методу Н. С. Короткова [Иванов, Лившиц, 2005] с использованием стандартных возрастных манжет при каждом визите пациента. Артериальное давление измеряли трехкратно с интервалом 5 мин. на обеих верхних конечностях с подсчетом среднего показателя. Нормальным систолическим и диастолическим артериальным давлением считается значение <90-го перцентиля кривой распределения АД, высокое нормальное АД ≥ 90 и <95-го перцентиля, АД в гипертензивном состоянии ≥ 95 -го перцентиля кривой распределения АД в популяции для соответствующего возраста, пола и роста. У подростков 16 лет используются единые критерии диагностики нормального (<130/85 мм рт. ст.), высокого нормального АД ($\geq 130/85$ мм рт. ст.) и $\geq 140/90$ мм рт. ст. для артериальной гипертензии [Александров и др., 2009].

ДНК выделяли методом тотального осаждения и лизиса SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, додецил сульфат натрия) с помощью коммерческого набора реагентов «EX-511 ДНК-Экстран-2» (Синтол, Россия) в соответствии с инструкцией. Концентрацию проб ДНК определяли с помощью спектрофотометра Spectrofotometr™ NanoDrop 2000 «Thermo scientific» (USA). В ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) при использовании подхода распознавания аллелей (Allelic Discrimination) выявлялись аллели гена *CYP11B2*, а также аллельные варианты гена или генотипы, ассоциированные с артериальной гипертензией. Реактивы для выявления полиморфных локусов T344C гена *CYP11B2* (rs1799998) синтезированы в ООО «Синтол» (г. Москва, Россия). Реактивы для амплификации ДНК смешивали в нужном объеме непосредственно перед проведением исследований. К реакционной смеси добавляли 5 мкл пробы ДНК индивидуально каждого единоробца. В качестве контроля использовали: а) отрицательный контроль (ОКО); б) положительный контрольный образец (ПКО) для гена *CYP11B2* – ПКО 1 Т/Т, ПКО 2 Т/С, ПКО 3 С/С. Определение аллелей и генотипов проводилось при помощи программы Bio-Rad (USA) на амплификаторе CFX96 (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, USA). ПЦР-РВ для амплификации полиморфных локусов проводили по программе, описанной в инструкции к наборам реагентов. По каналу флуоресценции ROX (оранжевый, длина волны возбуждения/детекции 580/602 нм) качественно определялось наличие в пробе аллеля Т гена *CYP11B2*. По каналу флуоресценции HEX (зеленый, длина волны возбуждения/детекции 530/560 нм) можно обнаружить аллель С гена *CYP11B2*. Каждая проба была проанализирована индивидуально. Эксперимент повторялся дважды. ПЦР-РВ проведена при условиях, предусмотренных в инструкции производителя набора реагентов 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. Для хранения и обработки результатов исследований была создана матрица данных в виде электронных таблиц MS Excel 2010. Оценка взаимосвязи между двумя переменными (генотип и артериальное давление) осуществлялась с помощью корреляционного анализа Спирмена (r_s). Сравнение частот генотипов между разными группами испытуемых (с нормальным давлением и с артериальной гипертензией) выполняли с помощью критерия χ^2 – хи-квадрат.

Результаты и обсуждение

В ПЦР в реальном времени при использовании подхода распознавания аллелей (Allelic Discrimination) рост по каналу ROX указывает на присутствие аллеля Т гена *CYP11B2* (рис. 1). Рост по каналу HEX обозначает наличие аллеля С гена *CYP11B2* в пробе ДНК. Соответственно, присутствие обоих аллелей в пробе свидетельствует о наличии генотипа Т/С гена *CYP11B2*. Результаты подлежат учету только в случае, когда положительный контрольный образец имеет положительные результаты по каналам ROX и HEX, а отрицательный контрольный образец имеет отрицательные результаты по каналам ROX и HEX. Положительный контрольный образец необходим для определения специфичности набора реагентов к аллелям Т и С гена *CYP11B2*. Отрицательный контрольный образец необходим для подтверждения отсутствия в реакционной смеси контаминации и ингибирования

По результатам ПЦР в реальном времени было выявлено, что генотип Т/Т гена *CYP11B2*, ассоциированный с артериальной гипертензией, встречается у 38 человек (частота 0.26). Самый благоприятный генотип С/С, не ассоциированный с артериальной гипертензией, обнаружен у 41 человека (частота 0.28). Чаще всего в общей выборке дзюдоистов встречался генотип С/Т – у 68 человек (частота 0.46). Таким образом, можно сделать вывод, что в выборке преобладает генотип со средней предрасположенностью к развитию артериальной гипертензии, что соответствует нормальному распределению и выявленному процентному соотношению распространения гипертензии среди детей [Образцова и др., 2005].

Анализ результатов измерения артериального давления показал, что в группе дзюдоистов у 121 человека нормальное давление, а у 26 человек зарегистрирована артериальная гипертензия. Нами были выделены две группы для сравнения между собой, чтобы определить связь между генотипами исследуемых генов и артериальным давлением. Группа I включала испытуемых с нормальным давлением (121 чело-

век), Группа II состояла из 26 человек с артериальной гипертензией. Сравнение частот генотипов между Группой I испытуемых с нормальным давлением и Группой II с артериальной гипертензией выполняли с помощью критерия χ^2 – хи-квадрат (таблица).

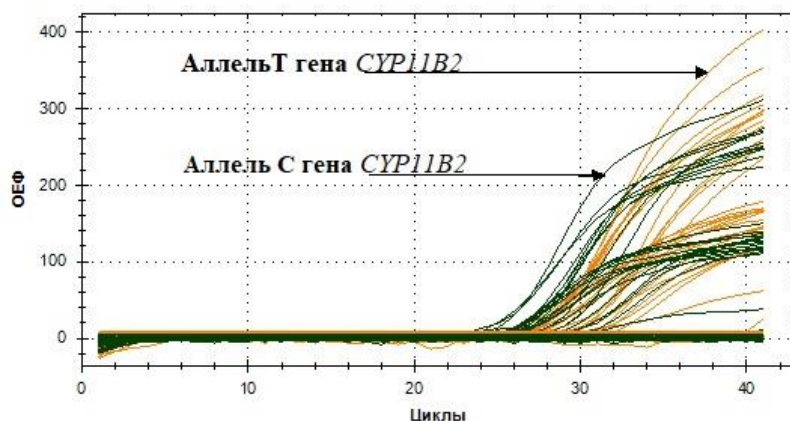


Рис. 1. Кинетические кривые флуоресценции, полученные для проб ДНК из буккального эпителия единоборцев при анализе гена *CYP11B2*.

Цвета, соответствующие каналам детекции флуоресценции: ROX (аллель Т гена *CYP11B2*) – оранжевый, HEX (аллель С гена *CYP11B2*) – 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 *CYP11B2* gene.

Colors corresponding to fluorescence detection channels: ROX (T allele of the *CYP11B2* gene) – orange, HEX (C allele of the *CYP11B2* gene) – green; RFU – relative fluorescence units, cycles – amplification cycles]

Полиморфизм гена *CYP11B2* у дзюдоистов с разным артериальным давлением (n=147)

[Polymorphism of the *CYP11B2* gene in judokas with different blood pressure (n=147)]

Генотипы	Группы с разным артериальным давлением (147 человек)		Частоты генотипа на общую выборку (147 человек)	χ^2	r_s
	Группа I – нормальное давление (121 человек)	Группа II – артериальная гипер- тензия (26 человек)			
C/C	0.34 (41)	0 (0)	0.28 (41)	0.589	0.597
C/T	0.48 (58)	0.38 (10)	0.46 (68)		
T/T	0.18 (22)	0.62 (16)	0.26 (38)		

Примечание. Сравнение частот генотипов между двумя группами выполняли с помощью критерия хи-квадрат (χ^2); оценка взаимосвязи между двумя переменными (генотип и наличие артериальной гипертензии) осуществлялась с помощью корреляционного анализа Спирмена (r_s); жирным шрифтом выделены значимые отличия.

С помощью критерия хи-квадрат была определена статистическая значимость между двумя выборками (Группой I с нормальным давлением и Группой II с артериальной гипертензией) и генотипами гена *CYP11B2*. Значение критерия $\chi^2_{\text{эмп}}$ составляет 0.589, критическое значение $\chi^2_{\text{кр}}$ при уровне значимости $p < 0.05$ составляет 5.991. Таким образом, связь между двумя выборками и генотипами гена *CYP11B2* статистически не значима при уровне значимости $p > 0.05$.

С помощью корреляционного анализа Спирмена осуществлялось сравнение между двумя переменными – генотипами и наличием артериальной гипертензии. Анализ полиморфизма T344C гена *CYP11B2* в двух группах у испытуемых с разным давлением выявил, что характеристики экспериментальных групп значимо отличаются друг от друга ($p = 0.001$), т.к. уровень значимости ниже 0.05. Корреляционный анализ (по критерию Спирмена) зависимости исследуемых показателей генотипа испытуемых и наличия артериальной гипертензии выявил наличие положительной связи ($r_s = 0.597$) между этими двумя переменными. Генотип T/T, ассоциированный с артериальной гипертензией, встречается у 22 человек (частота 0.18) в группе с нормальным давлением (Группа I), при этом генотип C/C, не ассоциированный с гипертензией, встречается в этой же группе чаще – у 41 человека (частота 0.34). В группе испытуемых с артериальной гипертензией генотип C/C не встречается, при этом генотип T/T и C/T обнаружен у 16 и 10 человек соответственно (частота 0.62 и 0.38). Таким образом, можно подтвердить ассоциацию T аллели с артериальной гипертензией и заключить, что генотип T/T гена *CYP11B2* имеет связь с артериальной гипертензией и в выборке испытуемых.

Распределение частот генотипов гена *CYP11B2*, ассоциированного с артериальной гипертензией, представлено на рис. 2.

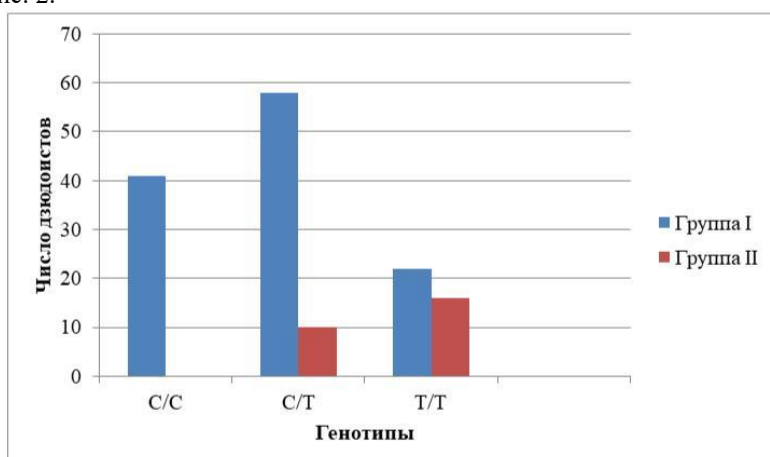


Рис. 2. Распределение частот генотипов гена *CYP11B2*, ассоциированного с артериальной гипертензией, у дзюдоистов (n=147).

Группа I с нормальным давлением, Группа II с артериальной гипертензией

[Distribution of genotype frequencies of the *CYP11B2* gene associated with arterial hypertension in judokas, n=147]

В данной выборке артериальная гипертензия обнаружена у 26 человек из 147 (17% от общей выборки). Не обнаружены достоверно значимые различия при анализе полиморфизма Т344С гена *CYP11B2* в двух группах по критерию хи-квадрат ($\chi^2_{\text{эмп}} = 0.589$ при $p > 0.05$), однако при оценке взаимосвязи между генотипом и наличием артериальной гипертензии при помощи корреляционного анализа Спирмена обнаружены достоверно значимые различия ($r_s = 0.597$). Прослеживается связь генотипа Т/Т гена *CYP11B2* и артериальной гипертензии, таким образом, данный генотип может быть использован в качестве маркерного.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе отбора отсеиваются спортсмены с неблагоприятными генотипами. Это происходит по многим причинам, одной из которых является их низкая работоспособность, обусловленная генетически, и долгое время восстановления после тренировки. Артериальная гипертензия является мультифакторным заболеванием, в связи с чем она может проявиться в более позднем возрасте. Одним из факторов развития гипертензии является стресс, который сопровождает спортсменов и на тренировках, и на соревнованиях.

В данном исследовании установлено, что генотип Т/Т гена *CYP11B2* может быть использован в качестве маркерного для определения развития артериальной гипертензии у дзюдоистов. Данные генетического анализа будут полезны в процессе подготовки единоборцев в спортивных школах, т.к. 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].

На основании всех полученных данных можно сделать вывод, что для спортсменов-единоборцев немаловажное значение имеет выявление генетической предрасположенности к развитию артериальной гипертензии, т.к. ее наличие может привести к развитию более серьезных заболеваний. Также состояние здоровья спортсмена напрямую влияет на его спортивные достижения. Изучение генетической предрасположенности спортсменов позволит в дальнейшем повысить надежность и эффективность системы индивидуального отбора и подготовки высококвалифицированных спортсменов. Полученные данные еще раз доказывают, что важно уделять особое внимание состоянию здоровья и интенсивности тренировок у единоборцев.

Список источников

1. Александров А.А. и др. Диагностика, лечение и профилактика артериальной гипертензии у детей и подростков. Российские рекомендации (второй пересмотр) // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2009. Т. 8, № 4 С. 1–32.
2. Баранов В.С. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб.: Н-Л, 2009. 528 с.

3. Вострикова А.В., Боронникова С.В., Закиров Р.М. Молекулярно-генетический анализ генов *ACTN3* и *AMPD1* у дзюдоистов спортивной школы по самбо и дзюдо «Витязь» г. Перми // Бюллетень науки и практики. 2020. № 4. С. 27–35.
4. Гурович Л.И., Иванова Г.П. Спортивные и подвижные игры: учебник. М.: Физкультура и спорт, 1977. 382 с.
5. Зеленская Е.М. и др. Ассоциация гена *CYP11B2* с риском развития гипертонической болезни и атеротромбических осложнений // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2016. Т. 15, № 3. С. 63–68.
6. Иванов С.Ю., Лившиц Н.И. Точность измерения артериального давления по тонам Короткова в сравнении с осциллометрическим методом // Вестник аритмологии. 2005. № 40. С. 55–58.
7. Кобалава Ж.Д. и др. Фибрилляция предсердий и артериальная гипертония: гендерные особенности предсердно-желудочкового ремоделирования при сохранной фракции выброса левого желудочка // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2017. Т. 13, № 4. С. 541–549.
8. Образцова Г.И. и др. Результаты суточного мониторинга артериального давления у детей и подростков с повышенным уровнем АД, обнаруженным при казуальных измерениях // Артериальная гипертония. 2005. Т. 11, № 1. С. 55–58.
9. Овечкин А.О. и др. Ремоделирование сердца при эссенциальной гипертонии, осложненной пароксизмальной фибрилляцией предсердий // Вестник аритмологии. 2000. № 20. С. 52–57.
10. Смоленский А.В., Михайлова А.В., Татарникова А.Ю. Артериальная гипертония у спортсменов и ремоделирование спортивного сердца // Международный журнал сердца и сосудистых заболеваний. 2017. Т. 5, № 14. С. 36–45.
11. Andersen K. Aldosterone synthase inhibition in hypertension // Curr. Hypertens. Rep. 2013. Vol. 15. P. 484–488.
12. Brand E. et al. Renin-angiotensin-aldosterone system and G-protein beta-3 subunit gene polymorphisms in salt-sensitive essential hypertension // Hypertension. 1998. Vol. 32. P. 198–204.
13. Davies E. et al. Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene *CYP11B2* // Hypertension. 1999. Vol. 33. P. 703–707.
14. Dzeshka M.S. et al. Hypertension and atrial fibrillation: an intimate association of epidemiology, pathophysiology, and outcomes // American journal of hypertension. 2017. Vol. 30, № 8. P. 733–755.
15. Jia M. et al. Association of *CYP11B2* polymorphisms with susceptibility to primary aldosteronism: a meta-analysis // Endocrine J., 2013. Vol. 60. P. 861–870.
16. Querejeta R. et al. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis // Circulation. 2004. Vol. 110, № 10. P. 1263–1268.
17. Kambouris M. et al. Predictive Genomics DNA Profiling for Athletic Performance // Recent Patents on DNA & Gene Sequences. 2012. Vol. 6, № 3. P. 229–239.
18. Longás Tejero M.A., Casanovas Lenguas J.A. Prevalence of hypertensive response to exercise in a group of healthy young male athletes. Relationship with left ventricular mass and prospective clinical implications // Rev. Esp. Cardiol. 1996. № 49. P. 104–110.
19. Izzo J. Hypertension in athletes // Clin. Hypertens. 2009. № 11. P. 226–233.
20. Lehmann M., Keul J. Incidence of hypertension in 810 male sportsmen // Z. Kardiol, 1984. № 73. P. 137–141.
21. Yu Y. et al. Proinflammatory cytokines upregulate sympathoexcitatory mechanisms in the subfornical organ of the rat // Hypertension. 2015. Vol. 65, № 5. P. 1126–1133.

References

1. Aleksandrov A.A., Kislyak O.A., Leont'eva I.V., Rozanov V.B. [Diagnosis, treatment and prevention of arterial hypertension in children and adolescents]. *Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika*. V. 8, No. 4 (2009): pp. 1–32. (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-Peterburg, N-L Publ., 2009. 528 p. (In Russ.).
3. Vostrikova A.V., Boronnikova S.V., Zakirov R.M. [Molecular genetic analysis of the *ACTN3* and *AMPD1* genes in judokas of the sports school for sambo and judo “Vityaz” in Perm]. *Bjulleten' nauki i praktiki*. No. 4 (2020): pp. 27–35. (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. Zelenskaya E.M., Koch N.V., Kireeva V.V., Apartsin K.A., Lifshitz G.I. [Association of the *CYP11B2* gene with the risk of developing hypertension and atherothrombotic complications]. *Kardiovaskulyarnaya terapija i profilaktika*, V. 15, No. 3 (2016): pp. 63–68. (In Russ.).
6. Ivanov S.Yu., Livshciz N.I. [Accuracy of blood pressure measurement using Korotkov tones in comparison with the oscillometric method]. *Vestnik aritmologii*, No. 40 (2005): pp. 55–58. (In Russ.).

7. Kobalava Zh.D., Kokhan E.V., Kiyakbaev G.K., Shavarov A.A. [Atrial fibrillation and arterial hypertension: gender-specific features of atrioventricular remodeling with preserved left ventricular ejection fraction]. *Racional'naja farmakoterapija v kardiologii*, V. 13, No. 4 (2017): pp. 541-549. (In Russ.).
8. Obrazsova G.I., Cheremnykh T.V., Kovalev Yu.R., Spetsakova O.A., Vitina N.I., Ivashikina T.M., Petrovtseva V.I. [Results of daily blood pressure monitoring in children and adolescents with elevated blood pressure detected during casual measurements]. *Arterial'naja gipertenzija*, V. 11, No. 1 (2005): pp. 55-58. (In Russ.).
9. Ovechkin A.O., Tarlovskaya E.I., Chapurny`x A.V., Tarlovskij A.K., Il`iny`x E.I. [Cardiac remodeling in essential hypertension complicated by paroxysmal atrial fibrillation]. *Vestnik aritmologii*. No. 20 (2000): pp. 52-57. (In Russ.).
10. Smolenskiy A.V., Mihailova A.V., Tatatinova A.Y. [Arterial hypertension in athletes and remodeling of the athlete's heart]. *Mezhdunarodnyj zhurnal serdca i sosudistych zabolevanij*. V. 5, No. 14 (2017): pp. 36-45. (In Russ.).
11. Andersen K. Aldosterone synthase inhibition in hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* V. 15 (2013): pp. 484-488.
12. Brand E., Chatelain N., Mulatero P. et al. Renin-angiotensin-aldosterone system and G-protein beta-3 subunit gene polymorphisms in salt-sensitive essential hypertension. *Hypertension*. V. 32 (1998): pp. 198-204.
13. Davies E., Holloway C.D., Ingram M.C. et al. Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene *CYP11B2*. *Hypertension*. V. 33 (1999): pp. 703-707.
14. Dzeshka M.S., Shahid F., Shantsila A., Lip G.Y.H. Hypertension and atrial fibrillation: an intimate association of epidemiology, pathophysiology, and outcomes. *American journal of hypertension*, V. 30, No. 8 (2017): pp. 733-755.
15. Jia M., Zhang H., Song X. et al. Association of *CYP11B2* polymorphisms with susceptibility to primary aldosteronism: a meta-analysis. *Endocrine J.* V. 60 (2013): pp. 861-870.
16. Querejeta R. et al. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. *Circulation*, V. 110, No. 10 (2004): pp. 1263-1268.
17. 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.
18. Longás Tejero M.A., Casanovas Lenguas J.A. Prevalence of hypertensive response to exercise in a group of healthy young male athletes. Relationship with left ventricular mass and prospective clinical implications. *Rev. Esp. Cardiol*. No. 49 (1996): pp. 104-110.
19. Izzo J. Hypertension in athletes. *Clin. Hypertens*, No. 11 (2009): pp. 226-233.
20. Lehmann M., Keul J. Incidence of hypertension in 810 male sportsmen. *Z. Kardiolog*, No. 73 (1984): pp. 137-141.
21. Yu Y., Wei S-G., Zhang Z-H., Felder R.B. Proinflammatory cytokines upregulate sympathoex-citatory mechanisms in the subfornical organ of the rat. *Hypertension*. V. 65, No. 5 (2015): pp. 1126-1133.

Статья поступила в редакцию 01.11.2024; одобрена после рецензирования 11.11.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 01.11.2024; approved after reviewing 11.11.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторе

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

Information about the author

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

ГЕНЕТИКА

Научная статья

УДК 575.174.015.3

EDN THLYAU

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-440-450



**Изучение роли полиморфизма генов репарации ДНК
в формировании предрасположенности к развитию
тройного негативного рака молочной железы у женщин**

**Р. А. Титов^{1, 2}, А. Н. Глушков¹, А. В. Торгунакова^{1, 2}, Я. А. Захарова^{1, 2},
А. В. Марущак¹, В. И. Минина^{1, 2}**

¹ Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, Кемерово, Россия

² Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

Авторы, ответственные за переписку: Руслан Александрович Титов, ruslan-tito00@rambler.ru и

Варвара Ивановна Минина, vminina@mail.ru

Аннотация. Обследованы 682 женщины русской национальности, проживающие в Кемеровской обл. России, в том числе 213 больные тройным негативным раком молочной железы и 465 женщин близкого возраста, не имеющих признаков онкологических заболеваний. Проведен сравнительный анализ полиморфных вариантов генов репарации ДНК *APEX1 444T>G* (*rs1130409*), *ATM 5557G >A* (*Ars180151*), *hOGG1 977C>G* (*rs1052133*), *XPB 2251T>G* (*rs13181*), *XPG 3310G>C* (*rs17655*), *ADPRT 2285 T>C* (*rs11610*) у больных раком молочной железы и индивидов, не имеющих онкологических заболеваний, проживающих в той же местности. Анализ однолокусных эффектов показал значимую связь между риском рака молочной железы и вариантами гена *XPG 3310G>C* (*rs17655*) (OR = 0.64, CI: 0.47-0.87, p = 0.004) в общей группе и (OR = 0.68, 95% CI: 0.49-0.94; p = 0.019) в некурящей группе, и гена *XPB 2251T>G* (OR = 0.30, 95% CI: 0.11-0.78 ; p = 0.011) в курящей группе. MDR-анализ межгенных взаимодействий показал, что гены *XPB 2251T>G* и *APEX1 444T>G*, *XPG 3310G>C* и *ATM 5557G >A* тесно взаимодействуют и взаимно усиливают риск развития рака молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, тройной негативный, полиморфизм генов *APEX1*, *ATM*, *hOGG1*, *XPB*, *XPG*, *ADPRT*

Для цитирования: Изучение роли полиморфизма генов репарации ДНК в формировании предрасположенности к развитию тройного негативного рака молочной железы у женщин / Р. А. Титов, А. Н. Глушков, А. В. Торгунакова, Я. А. Захарова, А. В. Марущак, В. И. Минина // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 440–450. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-440-450>.

Благодарности: работа выполнена в рамках госзадания АААА-А21-121011590009-9 «Иммуногормональные взаимодействия при раке молочной железы».

GENETICS

Original article

**Study of polymorphism of DNA repair genes in the formation of
presposition to the development of triple negative breast cancer
in women**

**R. A. Titov^{1, 2}, A. N. Glushkov¹, A. V. Torgunakova^{1, 2}, Y. A. Zakharova^{1, 2},
A. V. Maruschak¹, V. I. Minina^{1, 2}**

¹ Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, RAS, Kemerovo, Russia

² Kemerovo state university, Kemerovo, Russia

Corresponding authors: Ruslan A. Titov, ruslan-tito00@rambler.ru and Varvara I. Minina, vminina@mail.ru

Abstract. The study involved 682 women of Russian nationality living in Kemerovo oblast of Russia, including 213 patients with triple-negative breast cancer and 249 women of a similar age with no signs of cancer. Comparative analysis of polymorphic variants of DNA repair genes *APEX1 444T>G* (*rs1130409*), *ATM 5557G >A* (*Ars180151*), *hOGG1 977C>G* (*rs1052133*), *XPB 2251T>G* (*rs13181*), *XPG 3310G>C* (*rs17655*), *ADPRT 2285 T>C* (*rs11610*) in patients with triple-negative breast cancer and individuals without cancer living in the

same area was performed. Analysis of single-locus effects showed significant associations between the risk of breast cancer and variants of the *XPG 3310G>C* gene (rs17655) (OR = 0.64, CI: 0.47-0.87, p = 0.004) in the overall group and (OR = 0.68, 95% CI: 0.49 -0.94; p = 0.019) in the non-smoking group, and the *XPB 2251T>G* gene (OR = 0.30, 95% CI: 0.11-0.78; p = 0.011) in the smoking group. MDR analysis of intergenic interactions showed that the *XPB 2251T>G* and *APEX1 444T>G*, *XPG 3310G>C* and *ATM 5557G>A* genes closely interact and mutually increase the risk of developing breast cancer in women.

Keywords: breast cancer, triple negative, polymorphism of the *APEX1*, *ATM*, *hOGG1*, *XPB*, *XPG*, *ADPRT* genes

For citation: Titov R.A., Glushkov A.N., Torgunakova A.V., Zakharova Y.A., Maruschak A.V., Minina V.I. [Study of polymorphism of DNA repair genes in the formation of predisposition to the development of triple negative breast cancer in women]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 4 (2024): pp. 440-450. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-440-450>.

Acknowledgments: the work was carried out within the framework of the state assignment AAAA-A21-121011590009-9 “Immuno-hormonal interactions in breast cancer”.

Рак молочной железы (РМЖ) — наиболее распространенная злокачественная опухоль, возникающая у женщин и занимающая второе место в мировой статистике по смертности [Siegel et al., 2021; Злокачественные..., 2021]. Благодаря новым методам профилактики и лечения смертность из-за этого заболевания постепенно снижается. Данная злокачественная патология характеризуется высокой степенью гетерогенности и дополнительно подразделяется на несколько типов. Классификация РМЖ основана на экспрессии молекулярных маркеров. Тройной негативный рак характеризуется наихудшим прогнозом. Этот тип РМЖ встречается примерно у 15% пациенток. При этом на поверхности опухолевых клеток нет рецепторов эстрогена и прогестерона, а экспрессия рецепторов эпидермального фактора роста (HER-2) нормальная. Это делает их крайне нечувствительными к терапии существующими на сегодняшний день препаратами, включая те, что целенаправленно действуют на HER-2 или гормональные препараты.

Согласно данным исследований известно, что РМЖ появляется в результате генетических и гормональных изменений, возникающих под действием факторов окружающей среды и профессиональной деятельности, тесно связан с неправильным образом жизни (употребление алкоголя и табака, лишний вес и ожирение, физическая инертность) и репродуктивной историей (возраст менархе, возраст первых родов, кормление грудью) [Sun et al., 2017; Obeagu, Obeagu, 2024]. Репарация ДНК является частью барьеров, защищающих от мутаций, увеличивающих риск онкопатологии [Torgovnick, Schumacher, 2015; Kurfurstova et al., 2016]. Репарация ДНК отвечает за поддержание целостности генома путем защиты клеток от генетических и экологически обусловленных нарушений. Гены, связанные с механизмами репарации ДНК, считаются генами-кандидатами предрасположенности к раку, поскольку нарушение механизмов поддержания целостности генома может привести к злокачественной трансформации [Rudolph, Chang-Claude, Schmidt, 2016]. Однако точные молекулярные механизмы развития рака молочной железы все еще находятся на стадии интенсивного изучения.

В нашем исследовании мы сосредоточились на оценке роли однонуклеотидных полиморфизмов генов (SNP) репарации ДНК в формировании наследственной предрасположенности к РМЖ у женщин, проживающих в промышленно развитом регионе. Основными задачами нашей работы было выявление активно изучаемых вариантов в генах репарации ДНК: *APEX1 444T>G* (rs1130409), *ATM 5557G >A* (rs180151), *hOGG1 977C>G* (rs1052133), *XPB 2251T>G* (rs13181), *XPG 3310G>C* (rs17655), *ADPRT 2285 T>C* (rs11610) у женщин Кемеровской обл. и оценка их эффектов относительно риска формирования онкопатологии. Результаты нашего исследования помогут наилучшим образом раскрыть молекулярную основу предрасположенности к РМЖ и лечь в основу профилактики данного типа рака.

Целью нашего исследования была оценка риска развития тройного негативного РМЖ у женщин Кемеровской обл. в соответствии с носительством полиморфных вариантов генов репарации ДНК.

Материалы и методы исследований

Были обследованы 682 женщины (русские по этнической принадлежности), проживающие на территории Кемеровской обл. РФ. От каждого человека было получено информированное согласие на участие в исследовании. Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации: этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации 19.06.2003 г. Проведение исследования было утверждено комитетом по этике Института экологии человека Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН.

Группы формировались по принципу «случай–контроль» с учетом возраста, пола, этнической принадлежности и влияния факторов среды. Критерии включения: русские женщины, проживающие в Кемеровской обл. с момента рождения, возраст старше 40 лет. Критерии исключения: наличие наслед-

ственных, аутоиммунных, аллергических, психических заболеваний, родственников с онкозаболеваниями, ранее диагностированный рак других органов. В первую группу вошли 217 впервые выявленных больных РМЖ (средний возраст 58.9 ± 10.5). Диагноз РМЖ устанавливался по результатам клинического, эндоскопического и морфологического обследования на базе Кузбасского областного онкологического диспансера. Контрольную группу составили 465 не родственных женщин без онкозаболеваний в анамнезе, проживающих в той же местности (средний возраст 54.79 ± 8.2). Все здоровые доноры, включенные в контрольную группу (онкопатология молочных желез была исключена по результатам маммографии и обследования у маммолога), не принимали препаратов с известным мутагенным действием и не проходили рентгенологических процедур в течение трех месяцев до участия в исследовании. ДНК выделяли из венозной крови с использованием стандартной методики фенольно-хлороформной экстракции [Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989]. После выделения клетки крови подвергались лизированию, белковая компонента разрушалась протеиназой К (SibEnzyme, Новосибирск, Российская Федерация). С учетом анализа данных литературы нами были выбраны полиморфные локусы генов *APEX1* 444T>G (*rs1130409*), *ATM* 5557G >A (*Ars180151*), *hOGG1* 977C>G (*rs1052133*), *XPD* 2251T>G (*rs13181*), *XPG* 3310G>C (*rs17655*), *ADPRT* 2285 T>C (*rs11610*). Частота редкого аллеля в популяциях европеоидов учитывалась по данным доступного ресурса National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Типирование полиморфных маркеров проводилось с помощью аллель-специфической ПЦР (ООО «Литех НПП», Москва, Россия). Амплификацию проводили на термоциклере «Терцик» по программе, рекомендованной производителем наборов реагентов. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 3%-ном агарозном геле наличием бромистого этидия. Последующая визуализация фрагментов ДНК осуществлялась в камере с УФ-светом. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов прикладных программ: SNPstat (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>), STATISTICA 10.0, MDR (<http://www.multifactorialdimensionalityreduction.org>). Проводили оценку частоты аллелей и генотипов; анализировали соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга; оценивали статистическую значимость различий между группами по частотам аллелей и генотипов с учетом теста χ^2 на гомогенность выборок (статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$). Логистическую регрессию использовали для выявления ассоциации полиморфных локусов в различных моделях наследования (аддитивной, доминантной, сверхдоминантной, рецессивной, лог-аддитивной) с коррекцией на возраст, статус курения. Для выбора лучшей модели использовали информационный критерий Акайке (AIC). Исследование эффектов межгенных взаимодействий проводили в программе MDR – Multifactor Dimensionality Reduction (<http://www.multifactorialdimensionalityreduction.org>).

Результаты

Частоты генотипов и аллелей исследованных полиморфных локусов показали соответствие равновесию Харди–Вайнберга как в группе больных РМЖ, так и в группе здоровых (табл. 1).

Таблица 1

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов репарации ДНК

[The genotype and allele frequency distribution at the polymorphic DNA repair gene loci]

Локусы и генотипы	Генотипы и аллели	Больные РМЖ (Case)	Здоровые женщины (Control)	χ^2	p
<i>APEX1</i> 444 T>G <i>rs1130409</i>	TT	80 (36.9%)	159 (34.3%)	0.54	0.69
	TG	108 (49.8%)	232 (50.1%)		
	GG	29 (13.4%)	72 (15.6%)		
	T/G	268(0.62)/166(0.38)	550(0.59)/376(0.41)		
	p^{HWE}	0.47	0.44		
<i>ATM</i> 5557G >A <i>Ars180151</i>	GG	149 (73%)	352 (75.7%)	3.1	0.15
	GA	46 (22.6%)	105 (22.6%)		
	AA	9 (4.4%)	8 (1.7%)		
	G/A	344(0.84)/64(0.16)	809(0.87)/121(0.13)		
	p^{HWE}	0.6	1		
<i>hOGG1</i> 977 C>G <i>rs1052133</i>	CC	130 (59.9%)	289 (62.8%)	1.3	0.4
	CG	79 (36.4%)	147 (32%)		
	GG	8 (3.7%)	24 (5.2%)		
	C/G	339(0.78)/95(0.22)	725(0.79)/195(0.21)		
	p^{HWE}	0.43	0.33		

Локусы и генотипы	Генотипы и аллели	Больные РМЖ (Case)	Здоровые женщины (Control)	χ^2	p
<i>XPB</i> 2251 T>G <i>rs13181</i>	TT	98 (45.2%)	211 (45.4%)	0.01	0.995
	TG	93 (42.9%)	198 (42.6%)		
	GG	26 (12%)	56 (12%)		
	T/G	289(0.67)/145(0.33)	620(0.67)/310(0.33)		
	p^{HWE}	0.65	0.4		
<i>XPG</i> 3310 G>C <i>rs17655</i>	GG	72 (47.7%)	257 (60.8%)	7.4	0.015
	GC	67 (44.4%)	147 (34.8%)		
	CC	12 (8%)	19 (4.5%)		
	G/C	211(0.7)/91(0.3)	661(0.78)/185(0.22)		
	p^{HWE}	0.57	0.89		
ADPRT 2285 T>C <i>rs11610</i>	TT	137 (70.6%)	309 (66.6%)	1.7	0.31
	TC	50 (25.8%)	144 (31%)		
	CC	7 (3.6%)	11 (2.4%)		
	A/C	324(0.84)/64(0.16)	762(0.82)/166(0.18)		
	p^{HWE}	0.43	0.27		

Примечание. p^{HWE} – значимость отличий распределения частот генотипов от равновесия Харди–Вайнберга (exact test for Hardy–Weinberg equilibrium); p – значимость отличий частоты встречаемости генотипа в группе больных и здоровых, критерий χ^2 с поправкой Йетса.

При сравнении изученных групп жительниц Кемеровской области больных РМЖ и здоровых было выявлено отличие частот по вариантам гена *XPG3310G>C* (*rs17655*).

Расчеты соотношения шансов для различных моделей наследования (табл. 2) показали, что для полиморфного варианта *XPG 3310 G>C* ассоциации с риском РМЖ наиболее значимо проявлялись в сверхдоминантной модели наследования в общей группе (OR_{adj} = 0.64, 95% CI: 0.47-0.87; padj = 0.004, AIC 657.3) и в лог-аддитивной модели в группе некурящих (OR_{adj} = 0.68, 95% CI: 0.49-0.94; padj = 0.019, AIC 552.2).

Таблица 2

Результаты анализа ассоциаций полиморфных локусов генов-кандидатов с риском РМЖ

[Results of the analysis of polymorphic loci associations of candidate gene with the risk of breast cancer]

Локусы и генотипы	Группа	Модель	OR _{adj}	p	AIC
<i>APEX1</i> 444 T>G <i>rs1130409</i>	Общая	Лог-аддитивная	1.11 (0.87-1.41)	0.4	854.9
	Курящие	Доминантная	2.49 (0.94-6.57)	0.064	111.3
	Некурящие	Лог-аддитивная	1.20 (0.92-1.56)	0.18	695.9
ATM 5557G >A Ars180151	Общая	Рецессивная	0.38 (0.14-1.00)	0.051	823.5
	Курящие	Сверхдоминантная	0.76 (0.26-2.16)	0.6	110.5
	Некурящие	Рецессивная	0.35 (0.12-1.03)	0.056	673.7
<i>hOGG1</i> 977 C>G <i>rs1052133</i>	Общая	Сверхдоминантная	0.82 (0.58-1.15)	0.25	852
	Курящие	Сверхдоминантная	0.61 (0.24-1.54)	0.3	113.6
	Некурящие	Сверхдоминантная	0.86 (0.59-1.25)	0.43	694.5
<i>XPB</i> 2251 T>G <i>rs13181</i>	Общая	Сверхдоминантная	0.99 (0.72-1.37)	0.96	857.2
	Курящие	Доминантная	0.30 (0.11-0.78)	0.011	108.2
	Некурящие	Доминантная	1.19 (0.83-1.70)	0.33	698.4
<i>XPG</i> 3310 G>C <i>rs17655</i>	Общая	Лог-аддитивная	0.64 (0.47-0.87)	0.004	657.3
	Курящие	Доминантная	0.36 (0.11-1.14)	0.08	75.7
	Некурящие	Лог-аддитивная	0.68 (0.49-0.94)	0.019	552.2
ADPRT 2285 T>C <i>rs11610</i>	Общая	Сверхдоминантная	1.30 (0.89-1.89)	0.17	800.2
	Курящие	Сверхдоминантная	3.55 (1.06-11.84)	0.27	97.6
	Некурящие	Рецессивная	0.61 (0.21-1.80)	0.38	659.9

Примечание. OR_{adj} – показатель отношения шансов для редкого аллеля с поправкой на возраст. P – значимость различий между группами. AIC – критерий Акайке.

Для гена *XPB2251 T>G* наиболее значимые ассоциации проявлялись в доминантной модели наследования в группе пациентов, характеризующихся употреблением табачных изделий (OR_{adj} = 0.30, 95% CI: 0.11-0.78 ; padj = 0.011, AIC 108.2).

Связи риска развития злокачественных новообразований молочной железы с полиморфизмами других генов системы репарации ДНК выявлено не было.

В результате анализа межгенных взаимодействий методом MDR были определены две трехлокусные модели, связанные с риском развития РМЖ у женщин (табл. 3).

Таблица 3

Анализ межгенных взаимодействий при формировании РМЖ у женщин
[Analysis of intergenic interactions in the formation of breast cancer in women]

Сочетания полиморфных локусов в модели	Tr. Bal. Acc.	Test. Bal. Acc.	Sign Test (P)	Se	Sp	CVC	Pre.
модели							
<i>XPД 2251Т>G*</i> <i>APEX1444 Т>G</i> <i>XPГ 3310G>C</i> (курящие)	0.8484	0.622	0.0001	0.9375	0.7381	10/10	0.5769
<i>XPГ 3310G>C*</i> <i>ATM5557G>A</i> <i>XPД 2251Т>G</i> (некурящие)	0.6182	0.509	0.0001	0.5891	0.6398	8/10	0.3958

Примечание. Tr.Bal.Acc. – тренировочная сбалансированная точность; Test.Bal.Acc. – тестируемая сбалансированная точность; Sign Test – тест на значимость; Se – чувствительность; Sp – специфичность; CVC – повторяемость результата; Pre. (Precision) – точность модели; * алгоритм полного поиска (Exhaustive search algorithm).

Первая модель включала в себя полиморфизмы *XPД 2251Т>G*, *APEX 1444 Т>G* и *XPГ 3310G>C*. Кластерный анализ позволил установить тесное взаимодействие и взаимное усиление эффектов (синергизм) между полиморфными локусами *XPД 2251Т>G* и *APEX1444 Т>G*, данный кластер взаимодействует с геном *XPГ 3310G>C* с дублирующим эффектом.

Вторая модель ген-генного взаимодействия, ассоциированная с развитием РМЖ у некурящих женщин, включала полиморфные варианты генов *XPГ 3310G>C*, *ATM 5557G>A* и *XPД 2251Т>G*. Выявлен кластер тесно взаимодействующих генов *XPГ 3310G>C* и *ATM 5557G>A*, эффекты которых синонимичны. Данный кластер образовывал единый блок с геном *XPД 2251Т>G* с дублирующим эффектом данных генов (рис. 1).



Модель 1. Курящие женщины



Модель 2. Некурящие женщины

Рис. 1. Дендрограмма межгенных взаимодействий у женщин больных РМЖ.

Короткие линии указывают на сильное взаимодействие генных локусов, длинные – на слабую связь; черным цветом указывается синергизм, т.е. взаимное усиление эффектов между локусами, серым – дублирование эффектов между локусами

[Dendrogram of intergenic interactions in women with breast cancer.

Short lines indicate strong interaction of gene loci, long lines indicate weak connection; black color indicates synergism, i.e. mutual enhancement of effects between loci, gray color indicates duplication of effects between loci]

Анализ комбинаций всех возможных вариантов модели в таблицах сопряженности позволил выявить 9 благоприятных и 9 негативных эффектов у курящих женщин и 10 благоприятных и 12 негативных у некурящих женщин комбинаций для развития тройного негативного РМЖ (рис. 2 и 3).

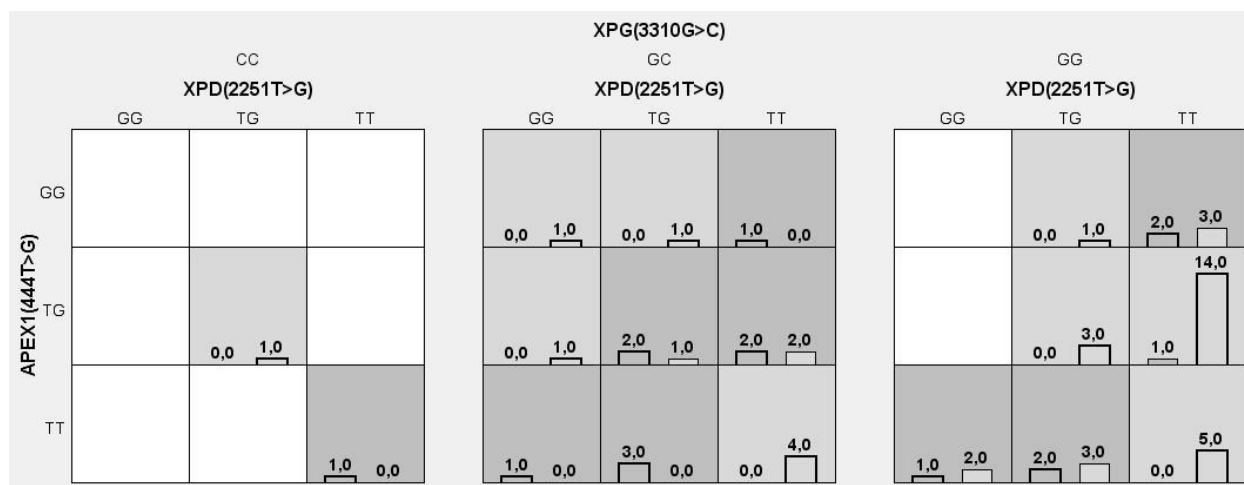


Рис. 2. Сочетания вариантов генов XPD 2251T>G, APEX1444 T>G и XPG 3310G>C, указывающих на предрасположенность к возникновению онкозаболеваний молочной железы у курящих женщин.

Сочетания вариантов генов, указывающих на повышенный риск развития заболевания – темно-серые ячейки, на пониженный риск – светло-серые ячейки, отсутствующие сочетания генотипов – белые ячейки (столбики в ячейках слева – пациентки с РМЖ, правые – здоровые женщины)

[Combinations of gene variants XPD 2251T>G, APEX1444 T>G and XPG 3310G>C indicating a predisposition to breast cancer in women who smoke.

Combinations of gene variants indicating a high risk of developing the disease - dark gray cells, lower risk - light gray cells, missing combinations of genotypes - white cells (bars in the cells on the left - patients with breast cancer, on the right - healthy women]

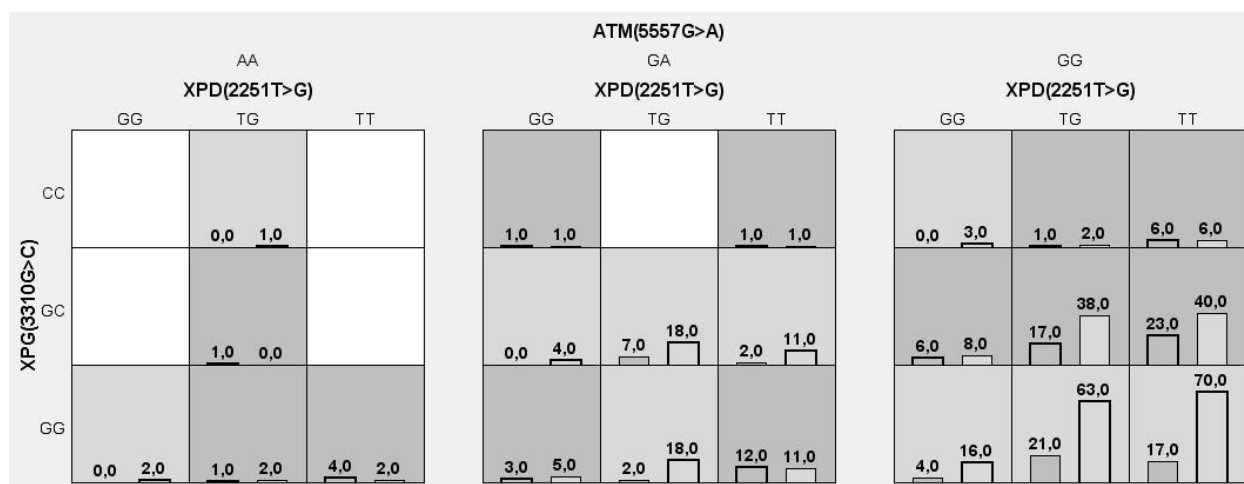


Рис. 3. Сочетания вариантов генов XPG 3310G>C, ATM 5557G>A и XPD 2251T>G, указывающих на предрасположенность к возникновению онкозаболеваний молочной железы у некурящих женщин

[Combinations of gene variants XPG 3310G>C, ATM 5557G>A and XPD 2251T>G indicating a predisposition to breast cancer in non-smoking women]

Обсуждение

Рак молочной железы является наиболее распространенным злокачественным заболеванием у женщин. По оценкам GLOBOCAN 2020 каждая четвертая женщина страдает раком молочной железы, а каждая восьмая женщина умирает от рака молочной железы. Женщины старшего возраста имеют высокий уровень заболеваемости раком молочной железы. В 2018 г. 645 000 против 1–4 млн случаев рака молочной железы и 130 000 против 490 000 смертей были зарегистрированы в пременопаузальной и постменопаузальной группах соответственно [Sung et al., 2021]. В метааналитическом исследовании было отмечено

но, что ранняя беременность и более длительное грудное вскармливание снижают ER (рецептор эстрогена) положительный и ER отрицательный риск развития рака молочной железы [Anstey et al., 2017; Fortner et al., 2019]. Поздний возраст вступления в брак и рождения ребенка приводит к недостаточной дифференциации тканей молочной железы, большому воздействию неэстрогенных мутагенов и генотоксичности эстрогенов, тем самым увеличивая риск РМЖ [Dey et al., 2009].

Кроме того, ожирение является еще одним сильным фактором риска развития рака молочной железы у женщин в постменопаузе, а также ассоциируется с плохим исходом заболевания у женщин всех возрастов [Picon-Ruiz et al., 2017, Guo et al., 2018]. Также продолжает расти количество данных, что курение сигарет связано с повышенным риском развития рака молочной железы [Reynolds, 2013; Reiner et al., 2022]. В исследовании Gram показано, что женщины, которые курили более 5 лет до родов по сравнению с теми, кто никогда не курил, имели более высокий риск развития рака молочной железы в целом на 42% (95% CI: 1.13–1.78). [Gram et al., 2019].

Тройной негативный тип рака молочной железы представляет собой большой интерес для фундаментальных исследований генетики в виду его агрессивного течения. Его клетки характеризуются большим пролиферативным и метастатическим потенциалом в другие органы. Данный тип РМЖ может дополнительно подразделяться на другие подтипы, учитывая особенности экспрессии генов и молекул РНК, а также белков в составе опухолей. В итоге различают шесть подтипов: базальный 1-ого типа, базальный 2-ого типа, мезенхимальный, подтип подобный мезенхимальным стволовым клеткам, люминальный AR и иммунномодуляторный типы [Lehmann et al., 2011]. Тройной негативный тип возникает в 12–17% случаев у молодых женщин, которые также являются носителями мутаций в области генов *BRCA*. Его спорадическое формирование во многом определяется эпигенетическими изменениями в составе *BRCA*. В виду своего агрессивного течения, тройной негативный тип РМЖ более чувствителен к химиотерапии, что определяет наилучший прогноз лечения [Liedke et al., 2008]. В особенности наилучшую выживаемость среди пациентов обеспечивает неоадьювантная терапия.

В результате проведенного настоящего исследования были выявлены ассоциации между унаследованными вариантами ряда генов ферментов репарации ДНК и риском тройного негативного РМЖ. Была показана статистическая значимость вариантов гена *XPG 3310G>C (rs17655)* в общей и группе некурящих пациентов, и гена *XPB 2251T>G (rs13181)* в группе курящих пациентов с риском формирования тройного негативного РМЖ у женщин, проживающих в промышленном регионе. По генам *APEX1 444T>G (rs1130409)*, *ATM 5557G>A (rs180151)*, *hOGG1 977C>G (rs1052133)*, *ADPRT 2285 T>C (rs11610)* статистически значимых ассоциаций выявлено не было.

Ген *XPG* кодирует белок, представляющий собой эндонуклеазу, которая вырезает поврежденный участок ДНК. *XPG* взаимодействует с комплексом ТФИИ и обеспечивает прикрепление хеликаз для правильного разъединения цепей ДНК, делая их доступными для действия эндонуклеаз. Нарушение взаимодействия *XPG*–ТФИИ приводит к диссоциации хеликаз и нарушению белкового комплекса, прерывая процесс репарации [Ito et al., 2007]. Adolf с соав. в своей работе показал, что генотип *His/His XPG* увеличивает риск РМЖ в 1.2 раза у молодых пациенток (<40 лет) ($p = 0.028$). Наличие генотипов *Asp/His+His/His* в 1.3 раза повышало риск развития РМЖ у пациенток с PR+ и в 1.1 раза снижало риск развития РМЖ у пациенток с люминальным-A типом РМЖ ($p = 0.014$, $p = 0.020$ соответственно) [Adolf et al., 2023]. Еще несколько ранее произведенных исследований также показали связь гена *XPG* с раком молочной железы [Na et al., 2015; Malik et al., 2018].

Ген *XPB (ERCC2)* кодирует АТФ-независимую хеликазу. Это ключевой белок эксцизионной репарации нуклеотидов (NER), который узнает и исправляет различные мутации, образующиеся, например, после УФ-облучения или окислительного стресса. В составе комплекса транскрипционных факторов (ТФИИ) хеликаза *XPB* раскручивает цепь ДНК, обеспечивая доступ эндонуклеаз к поврежденному участку [Broughton, Steingrimsdottir, Lehmann, 1996]. Полиморфизм *Lys751Gln (rs13181)* является одним из наиболее широко изученных генетических маркеров *XPB*, и его роль в развитии рака очевидна [Benhamou, Sarasin, 2002]. В работах Smolarz с соав. генотип *Gln/Gln* гена *XPB* был связан с повышенным риском РМЖ и с тройным негативным РМЖ [Smolarz et al., 2014, 2019]. Samson и др. также сообщали, что генотип *XPB Gln/Gln* значительно связан с повышенным риском рака молочной железы у женщин Южной Индии [Samson et al., 2011]. Точно также Roberts с коллегами пришли к выводу, что варианты генов BER и NER могут влиять на риск развития рака молочной железы у человека [Roberts et al., 2011].

В рамках настоящего исследования проведено моделирование межгенных взаимодействий методом MDR. Для оценки межгенных взаимодействий с помощью MDR-анализа в отношении риска развития РМЖ у женщин использовали алгоритм всестороннего поиска (Exhaustive search algorithm), который оценивал все возможные комбинации исследованных полиморфных локусов. В результате анализа были выявлены наиболее информативные модели межгенных взаимодействий, детерминирующих формирование тройного негативного РМЖ у женщин: *XPB 2251T>G*, *APEX 1444 T>G*, *XPG 3310G>C* и *XPG 3310G>C*, *ATM 5557G>A*, *XPB 2251T>G*. Первая модель межгенных взаимодействий включала в себя гены *XPB 2251T>G*, *APEX 1444 T>G*, *XPG*. Между генами *XPB* и *APEX* был выявлен сильный синергизм.

Ген *XPG* представляет собой локус с дублирующим эффектом. Вторую модель межгенных взаимодействий, связанную с развитием тройного негативного РМЖ у некурящих женщин, составили полиморфные локусы *XPG 3310G>C*, *ATM 5557G>A*, *XPB 2251T>G*. Между генами *XPG 3310G>C* и *ATM 5557G>A* было выявлено взаимно усиливающее действие, а ген *XPB 2251T>G* образовывал единый кластер с дублирующим эффектом данных генов.

Заключение

Подводя итог, можно сказать, что это исследование способствует раскрытию молекулярной основы тройного негативного рака молочной железы. Наши результаты указывают на гены репарации ДНК и их полиморфизмы, которые могут быть вовлечены в формирование рака молочной железы у женщин Кемеровской обл. Они могут найти практическое применение для улучшения диагностики рака на ранних стадиях развития и привести к снижению заболеваемости и смертности больных тройным негативным раком молочной железы.

Список источников

1. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М., 2021. 252 с.
2. Adolf I.C. et al. The interplay between XPG-Asp1104His polymorphism and reproductive risk factors elevates risk of breast cancer in Tanzanian women: A multiple interaction analysis // *Cancer Medicine*. 2023. Vol. 12. P. 472–487.
3. Anstey E.H. et al. Breastfeeding and breast cancer risk reduction: implications for black mothers // *American journal of preventive medicine*. 2017. Vol. 53, № 3. P. S40–S46.
4. Benhamou S., Sarasin A. ERCC2/XPB gene polymorphisms and cancer risk // *Mutagenesis*. 2002. Vol. 17. P. 463–469. DOI: 10.1093/mutage/17.6.463.
5. Broughton B.C., Steingrimsdottir H., Lehmann A.R. Five polymorphisms in the coding sequence of the Xeroderma pigmentosum group D gene // *Mutat. Res.* 1996. Vol. 362. P. 209–211.
6. Dey S. et al. Risk factors according to estrogen receptor status of breast cancer patients in Trivandrum, South India // *International journal of cancer*. 2009. Vol. 125(7). P. 1663–1670. DOI: 10.1002/ijc.24460.
7. Fortner R.T. et al. Parity, breastfeeding, and breast cancer risk by hormone receptor status and molecular phenotype: results from the Nurses' Health Studies // *Breast Cancer Research*. 2019. Vol. 21, № 1. P. 1–9.
8. Gram I.T. et al. Smoking and breast cancer risk by race/ethnicity and oestrogen and progesterone receptor status: the Multiethnic Cohort (MEC) study // *Int. J. Epidemiol.* 2019. Vol. 48, № 2. P. 501–511.
9. Guo W. et al. Adiposity and breast cancer risk in postmenopausal women: results from the UK Biobank prospective cohort // *International journal of cancer*. 2018. Vol. 143, № 5. P. 1037–1046.
10. Ito S. et al. XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: Implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients // *Mol. Cell*. 2007. Vol. 26. Art. 231.
11. Kurfurstova D. et al. DNA damage signalling barrier, oxidative stress and treatment-relevant DNA repair factor alterations during progression of human prostate cancer // *Mol. Oncol.* 2016. Vol. 10. P. 879–894. DOI: 10.1016/j.molonc.2016.02.005.
12. Lehmann B.D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies // *Journal of Clinical Investigation*. 2011. Vol. 121, № 7. P. 2750–2767. DOI: 10.1172/jci45014.
13. Liedke C. et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer // *J. Clin. Oncol.* 2008. Vol. 26. P. 1275–1281.
14. Malik S.S. et al. An insight into clinical outcome of XPG polymorphisms in breast cancer // *Molecular Biology Reports*. 2018. Vol. 45(6). P. 2369–2375. DOI: 10.1007/s11033-018-4401-7.
15. Na N. et al. Association between ERCC5 gene polymorphisms and breast cancer risk // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. Vol. 8, № 3. Art. 3192.
16. Obeagu E.I., Obeagu G.U. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis // *Medicine (Baltimore)*. 2024. Vol. 103, № 3. Art. e36905. DOI: 10.1097/MD.00000000000036905.
17. Picon-Ruiz M. et al. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: mechanistic insights and strategies for intervention // *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017. Vol. 67, № 5, P. 378–397.
18. Reiner A.S. et al. Smoking, Radiation Therapy, and Contralateral Breast Cancer Risk in Young Women // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2022. Vol. 114(4). P. 631–634. DOI: 10.1093/jnci/djab047.
19. Reynolds P. Smoking and Breast Cancer // *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*. 2013. Vol. 18, № 1. P. 15–23.
20. Roberts M.R. et al. Singlenucleotide polymorphisms in DNA repair genes and association with breast cancer risk in the web study // *Carcinogenesis*. 2011. Vol. 32. P. 1223–1230.

21. Rudolph A., Chang-Claude J., Schmidt M.K. Geneenvironment interaction and risk of breast cancer // *Br. J. Cancer*. 2016. Vol. 114, № 2. P. 125–133.
22. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1989. 1659 p.
23. Samson M. et al. XPD Lys751Gln increases the risk of breast cancer // *Oncol. Lett.* 2011. Vol. 2. P. 155–159.
24. Siegel R.L et al. *Cancer Statistics // CA Cancer J. Clin.* 2021. Vol. 71, № 1. P. 7–33.
25. Smolarz B. et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of ERCC2, hOGG1, and XRCC1 DNA repair genes and the risk of triple-negative breast cancer in Polish women // *Tumour Biol.* 2014. Vol. 35, № 4. P. 3495–3502.
26. Smolarz B. et al. Polymorphism of DNA repair genes in breast cancer // *Oncotarget*. 2019. Vol. 10, № 4. DOI: 10.18632/oncotarget.265688.
27. Sun Y.S. et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer // *Int. J. Biol. Sci.* 2017. Vol. 13, № 11. P. 1387–1397. DOI: 10.7150/ijbs.21635.
28. Sung H.J. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021. Vol. 71, № 3. P. 209–249.
29. Torgovnick A., Schumacher B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy // *Front Genet.* 2015. Vol. 6. Art. 157. DOI: 10.3389/fgene.2015.00157.

References

1. Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O., eds. *Zlokačestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2020 godu (zabolevaemost' i smertnost')* [Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality)]. Moscow, 2021. 252 p. (In Russ.).
2. Adolf I.C., Rweyemamu L.P., Akan G., Mselle T.F., Dharsee N., Namkinga L.A., Lyantagaye S.L., Atalar F. The interplay between XPG-Asp1104His polymorphism and reproductive risk factors elevates risk of breast cancer in Tanzanian women: A multiple interaction analysis. *Cancer Medicine*. V. 12 (2023): pp. 472-487.
3. Anstey E.H., Shoemaker M.L., Barrera C.M., O'Neil M.E., Verma A.B., Holman D. M. Breastfeeding and breast cancer risk reduction: implications for black mothers. *American journal of preventive medicine*. V. 53, No. 3 (2017): pp. S40-S46.
4. Benhamou S, Sarasin A. ERCC2/XPD gene polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis*. V. 17 (2002): pp. 463-469. DOI: 10.1093/mutage/17.6.463.
5. Broughton B.C., Steingrimsdottir H., Lehmann A.R. Five polymorphisms in the coding sequence of the Xeroderma pigmentosum group D gene. *Mutat. Res.* V. 362 (1996): pp. 209-211.
6. Dey S., Boffetta P., Mathews A., Brennan P., Soliman A., Mathew A. Risk factors according to estrogen receptor status of breast cancer patients in Trivandrum, South India. *International journal of cancer*. V. 125(7) (2009): pp. 1663-1670. DOI: 10.1002/ijc.24460.
7. Fortner R.T., Sisti J., Chai B., Collins L.C., Rosner B., Hankinson S.E., Tamimi R.M., Eliassen A.H. Parity, breastfeeding, and breast cancer risk by hormone receptor status and molecular phenotype: results from the Nurses' Health Studies. *Breast Cancer Research*. V. 21, No. 1 (2019): pp. 1-9.
8. Gram I.T., Park S., Maskarinec G., Wilkens L.R., Haiman C.A., Marchand L.L. Smoking and breast cancer risk by race/ethnicity and oestrogen and progesterone receptor status: the Multiethnic Cohort (MEC) study. *Int. J. Epidemiol.* V. 48, No. 2 (2019): pp. 501-511.
9. Guo W., Key T.J., Reeves G.K. Adiposity and breast cancer risk in postmenopausal women: results from the UK Biobank prospective cohort. *International journal of cancer*. V. 143, No. 5 (2018): pp. 1037-1046.
10. Ito S., Kuraoka I., Chymkowitch P., Compe E., Takedachi A., Ishigami C., Coin F., Egly J.M., Tanaka K. XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: Implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol. Cell*. V. 26 (2007). Art. 231.
11. Kurfurstova D., Bartkova J., Vrtel R., Mickova A., Burdova A., Majera D. et al. DNA damage signalling barrier, oxidative stress and treatment-relevant DNA repair factor alterations during progression of human prostate cancer. *Mol Oncol*. V. 10 (2016): pp. 879-894. DOI: 10.1016/j.molonc.2016.02.005.
12. Lehmann B.D., Bauer J.A., Chen X., Sanders M.E., Chakravarthy A.B., Shyr Y., Pietenpol J.A. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*. V. 121, No. 7 (2011): pp. 2750-2767. DOI: 10.1172/jci45014.
13. Liedtke C., Mazouni C., Hess K.R., André F., Tordai A., Mejia J.A. et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* V. 26 (2008): pp. 1275-1281.
14. Malik S.S., Mubarik S., Masood N., Khadim M.T. An insight into clinical outcome of XPG polymorphisms in breast cancer. *Molecular Biology Reports*. V. 45(6) (2018): pp. 2369-2375. DOI: 10.1007/s11033-018-4401-7.
15. Na N., Dun E., Ren L., Li G. Association between ERCC5 gene polymorphisms and breast cancer risk. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* V. 8, No. 3 (2015). Art. 3192.

16. Obeagu E.I., Obeagu G.U. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine* (Baltimore). V. 103, No. 3 (2024). Art. 36905. DOI: 10.1097/MD.00000000000036905.
17. Picon-Ruiz M., Morata-Tarifa C., Valle-Goffin J.J., Friedman E.R., Slingerland J.M. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: mechanistic insights and strategies for intervention. *CA: a cancer journal for clinicians*. V. 67, No. 5 (2017): pp. 378-397.
18. Reiner A.S., Watt G.P., John E.M., Lynch C.F., Brooks J.D., Mellemkjær L. et al. Smoking, Radiation Therapy, and Contralateral Breast Cancer Risk in Young Women. *JNCI. Journal of the National Cancer Institute*. V. 114(4) (2022): pp. 631-634. DOI:10.1093/jnci/djab047.
19. Reynolds P. Smoking and Breast Cancer. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*. V. 18, No. 1 (2013): pp. 15-23.
20. Roberts M.R., Shields P.G., Ambrosone C.B., Nie J., Marian C., Krishnan S.S. et al. Singlenucleotide polymorphisms in DNA repair genes and association with breast cancer risk in the web study. *Carcinogenesis*. V. 32 (2011): pp. 1223-1230.
21. Rudolph A., Chang-Claude J., Schmidt M.K. Geneenvironment interaction and risk of breast cancer. *Br. J. Cancer*. V.114, No. 2 (2016): pp. 125-133.
22. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. N.Y., Cold Spring Harbor Lab., 1989. 1659 p.
23. Samson M., Singh S.S., Rama R., Sridevi V., Rajkumar T. XPD Lys751Gln increases the risk of breast cancer. *Oncol Lett*. V. 2 (2011): pp. 155-159.
24. Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin*. V. 71, No. 1 (2021): pp. 7-33.
25. Smolarz B., Makowska M., Samulak D., Michalska M.M., Mojs E., Wilczak M., Romanowicz, H. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of ERCC2, hOGG1, and XRCC1 DNA repair genes and the risk of triple-negative breast cancer in Polish women. *Tumour Biol*. V. 35, No. 4 (2014): pp. 3495-3502.
26. Smolarz B., Michalska M.M., Samulak D., Romanowicz H., Wójcik L. Polymorphism of DNA repair genes in breast cancer. *Oncotarget*. V. 10, No. 4 (2019). DOI: 10.18632/oncotarget.265688).
27. Sun Y.S., Zhao Z., Yang Z.N., Xu F., Lu H.J., Zhu Z.Y. et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int. J. Biol. Sci*. V. 13, No. 11 (2017): pp.1387-1397. DOI: 10.7150/ijbs.21635.
28. Sung H.J., Ferlay R., Siegel L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA: a cancer journal for clinicians*. V. 71, No. 3 (2021): pp. 209-249.
29. Torgovnick A., Schumacher B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front Genet*. Vol. 6 (2015). Art. 157. DOI: 10.3389/fgene.2015.00157.

Статья поступила в редакцию 24.07.2024; одобрена после рецензирования 23.09.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 24.07.2024; approved after reviewing 23.09.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторах

Руслан Александрович Титов – ruslan-tito00@rambler.ru, ведущий инженер-технолог лаборатории цитогенетики, ведущий инженер-технолог кафедры генетики и фундаментальной медицины;
 Андрей Николаевич Глушков – ihe@list.ru, д-р мед. наук, профессор, директор;
 Анастасия Владимировна Торгунакова – kotia1490@mail.ru, ведущий инженер-технолог лаборатории цитогенетики, ведущий инженер-технолог кафедры генетики и фундаментальной медицины;
 Яна Александровна Захарова – yasavchenko@yandex.ru, канд. биол. наук, доцент кафедры генетики и фундаментальной медицины, старший научный сотрудник лаборатории цитогенетики;
 Анна Владимировна Марущак – marushchak.av@mail.ru, инженер-технолог лаборатории цитогенетики;
 Варвара Ивановна Минина – vminina@mail.ru, д-р биол. наук, доцент, зав. кафедры генетики и фундаментальной медицины, главный научный сотрудник лаборатории цитогенетики.

Information about the authors

Ruslan A. Titov – ruslan-tito00@rambler.ru, leading engineer of the laboratory of Cytogenetics, leading engineer of the Department of Genetics and Basic Medicine;
 Andrey N. Glushkov – ihe@list.ru, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director;
 Anastasia V. Torgunakova – kotia1490@mail.ru, leading engineer of the laboratory of Cytogenetics, leading engineer of the Department of Genetics and Basic Medicine;
 Yana A. Zakharova – yasavchenko@yandex.ru, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Genetics and Basic Medicine, Senior researcher at the Laboratory of Cytogenetics;
 Anna V. Maruschak – marushchak.av@mail.ru, engineer of the laboratory of Cytogenetics;
 Varvara I. Minina – vminina@mail.ru, Doctor of biology, assistant professor, head of the Department of Genetics and Basic Medicine, Chief Researcher of the Cytogenetics Laboratory.

Вклад авторов:

Титов Р. А. – сбор материала; лабораторный анализ; написание исходного текста; статистическая обработка материала.

Глушков А. Н. – научное руководство.

Торгунакова А. В. – сбор материала, лабораторный анализ.

Захарова Я. А. – доработка текста.

Марущак А. В. – сбор материала, лабораторный анализ.

Минина В. И. – научное руководство; доработка текста; итоговые выводы.

Contribution of the authors:

Titov R. A. – collecting material, laboratory analysis, writing the draft, statistical processing of the material.

Glushkov A. N. – research supervision.

Torgunakova A. V. – collecting material, laboratory analysis.

Zakharova Y. A. – text revision.

Maruschak A. V. – collecting material, laboratory analysis.

Minina V. I. – research supervision, text revision, final conclusions.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.

Научная статья

УДК 571.27:618.2:612.112.91

EDN UNFBTF

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-451-460



Фенотипические особенности гранулоцитов низкой плотности при физиологической беременности

Екатерина Григорьевна Орлова^{1, 2✉}, Ольга Александровна Логинова³,
Ольга Леонидовна Горбунова⁴, Сергей Викторович Ширшев⁵

^{1, 3-5} Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

^{1, 2✉} orlova_katy@mail.ru

³ jallopukki@ya.ru

⁴ olia15_77@mail.ru

⁵ shirshev@iegm.ru

Аннотация. При физиологической беременности в периферической крови увеличивается количество нейтрофилов низкой плотности, однако их фенотипические и функциональные особенности практически не изучены. Поэтому цель данной работы – изучение экспрессии молекул, характеризующих цитотоксичность (CD16, CD107a), транспорт глюкозы (GLUT-1) и состояние митохондрий (по включению красителя MitoSpy™ Green FM) гранулоцитами низкой плотности и в общем пуле гранулоцитов при физиологически протекающей беременности. Объектом исследования была периферическая кровь условно здоровых женщин в I и III триместрах физиологически протекающей беременности. Группу сравнения составили условно здоровые небеременные женщины в фолликулярной фазе менструального цикла. Гранулоциты низкой плотности анализировали как процент CD3⁺CD16⁺ клеток в мононуклеарных лейкоцитах, выделенных на градиенте плотности фиколла-урографина (1.077 г/мл). Общий пул гранулоцитов исследовали как процент CD3⁺CD16⁺ клеток в гейте гранулоцитов периферической крови после удаления эритроцитов. Среди гранулоцитов выделяли субпопуляции с высокой экспрессией CD16 (CD16^{hi}) и сниженной (CD16^{int}). Установлено, что у небеременных CD16^{hi} гранулоциты доминируют как в общем пуле, так и среди гранулоцитов низкой плотности. В динамике беременности количество гранулоцитов низкой плотности увеличивается, а CD16^{int} гранулоциты становятся доминирующей субпопуляцией как в общем пуле гранулоцитов, так и среди гранулоцитов низкой плотности. У небеременных и беременных в I триместре CD16^{hi}- и CD16^{int}-гранулоциты низкой плотности и общего пула сравнимы по экспрессии GLUT-1, CD107a, массе и объему митохондрий. В III триместре экспрессия CD107a на CD16^{int}-гранулоцитах низкой плотности и в общем пуле снижается по сравнению с небеременными, а масса и объем митохондрий увеличиваются и в CD16^{hi}, и CD16^{int}-гранулоцитах только общего пула по сравнению с I триместром. Полученные результаты расширяют наше понимание механизмов регуляции функций гранулоцитов при физиологической беременности.

Ключевые слова: гранулоциты низкой плотности, CD107a, Glut-1, митохондрии, беременность

Для цитирования: Фенотипические особенности гранулоцитов низкой плотности при физиологической беременности / Е. Г. Орлова, О. А. Логинова, О. Л. Горбунова, С. В. Ширшев // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 451–460. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-451-460>.

Благодарности: работа выполнена при поддержке госзадания ИЭГМ УрО РАН (№ гос. регистрации 124020500027-7).

IMMUNOLOGY

Original article

Phenotypic features of low-density granulocytes in physiological pregnancy

Ekaterina G. Orlova^{1, 2✉}, Olga A. Loginova³, Olga L. Gorbunova⁴,
Sergey V. Shirshev⁵

^{1, 3-5} Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, PFRC Ural Branch of the RAS, Perm, Russia

² Perm State University, Perm, Russia

^{1, 2}✉ orlova_katy@mail.ru

³ jallopukki@ya.ru

⁴ olia15_77@mail.ru

⁵ shirshev@iegm.ru

Abstract. During physiological pregnancy, the number of low-density neutrophils in the peripheral blood increases, but their phenotypic and functional features have not been practically studied. Therefore, the aim of this work is to study the expression of molecules characterizing cytotoxicity (CD16, CD107a), glucose transport (GLUT-1) and the state of mitochondria (by the inclusion of the MitoSpyGreen FM dye) by low-density granulocytes and in the general pool of granulocytes during physiologically proceeding pregnancy. The object of the study was the peripheral blood of conditionally healthy women in the first and third trimesters of physiological pregnancy. The comparison group consisted of conditionally healthy non-pregnant women in the follicular phase of the menstrual cycle. Low-density granulocytes were analyzed as a percentage of CD3⁺CD16⁺ cells in mononuclear leukocytes isolated on a ficoll-urographin density gradient (1.077 g/ml). The total granulocyte pool was studied as the percentage of CD3⁺CD16⁺ cells in the gate of peripheral blood granulocytes after removal of erythrocytes. Among granulocytes, subpopulations with high CD16 (CD16^{hi}) and reduced CD16^{int} expression were isolated. It was found that in non-pregnant women CD16^{hi} granulocytes dominate both in the general pool and among low-density granulocytes. During pregnancy, the number of low-density granulocytes increases and CD16^{int} granulocytes become the dominant subpopulation both in the general pool of granulocytes and among low-density granulocytes. In non-pregnant and pregnant women in the first trimester, CD16^{hi}- and CD16^{int}-granulocytes of low density and total pool are comparable in expression of GLUT-1, CD107a, mass and volume of mitochondria. In the third trimester, CD107a expression on low-density CD16^{int} granulocytes and in the general pool decreases compared to non-pregnant ones, and the mass and volume of mitochondria increase in both CD16^{hi} and CD16^{int} granulocytes of the general pool only compared to the first trimester. The results obtained expand our understanding of the mechanisms regulating granulocyte functions during physiological pregnancy.

Keywords: low-density granulocytes, CD107a, Glut-1, mitochondria, pregnancy

For citation: Orlova E. G., Loginova O. A., Gorbunova O.L., Shirshov S. V. [Phenotypic features of low-density granulocytes in physiological pregnancy]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 4 (2024): pp. 451-460. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-451-460>.

Acknowledgments: this study was carried out within the framework of the state task, the state topic registration number: N 124020500027-7.

Введение

Физиологическая беременность характеризуется глубокими изменениями функций клеток как адаптивного, так и врожденного иммунитета, что необходимо для выживания полуаллогенного плода и сохранения защитных свойств организма матери [Ширшев, 2009]. Нейтрофилы преобладают среди гранулоцитов периферической крови и являются ведущими эффекторами врожденного иммунитета. Их функции не ограничиваются обеспечением противомикробной защиты. Нейтрофилы активно инфильтруют ткани матки, стимулируют ангиогенез, выполняют регуляторные функции, участвуют в репарации, а стимуляция их фагоцитарной и цитотоксической активности ассоциирована со спонтанными абортными [Циркин и др., 2015; Потапнев, Гущина, Мороз, 2019]. При физиологической беременности происходит увеличение относительного и абсолютного содержания нейтрофилов в периферической крови, их фагоцитарная и цитотоксическая активность снижается, что является частью системного гормон-зависимого угнетения цитотоксических реакций при беременности и необходимо для сохранения плода [Ширшев, Кукина, Баженова, 2008; Патурова и др., 2018].

Физиологическая беременность характеризуется увеличением количества нейтрофилов низкой плотности [Denny et al., 2010; Ssemaganda et al., 2014; Ye et al., 2023]. Нейтрофилы низкой плотности выделяются вместе с фракцией мононуклеарных клеток периферической крови при разделении методом седиментации на градиенте плотности фикола-урографина (1.077 г/см³) [Denny et al., 2010; Ye et al., 2023]. Подобные клетки присутствуют и у здоровых доноров вне беременности, но не превышают 1–2% [Denny et al., 2010; Ye et al., 2023]. Количество нейтрофилов низкой плотности значительно повышается при воспалении, аутоиммунных процессах, онкологических заболеваниях [Denny et al., 2010; Carmona-Rivera, Kaplan, 2013; Yang et al., 2019; Ning, Wang, Jin, 2022]. При подобных патологических состояниях нейтрофилы низкой плотности характеризуются как преимущественно незрелые, избыточно экспрессирующие маркеры активации, способные к спонтанному формированию нейтрофильных ловушек, активной продукции провоспалительных цитокинов и цитотоксичности в отношении эндотелиальных клеток [Denny et al., 2010; Carmona-Rivera, Kaplan, 2013; Yang et al., 2019; Ning, Wang, Jin, 2022]. При физиологической беременности нейтрофилы низкой плотности не отличаются по маркерам зрело-

сти/дифференцировки, активационного статуса, бактерицидности от нейтрофилов нормальной плотности [Ssemaganda et al., 2014; Deniset, Kubes, 2018], но имеют сниженную фагоцитарную активность [Denny et al., 2010; Ye et al., 2023]. Предполагается, что эти клетки способны к индукции формирования Т-регуляторных лимфоцитов в зоне фето-плацентарного контакта [Ssemaganda et al., 2014; Deniset, Kubes, 2018]. Однако их функциональные особенности, как и динамика их численности при физиологической беременности, остаются малоизученными.

Нейтрофилы периферической крови отличаются по экспрессии молекулы CD16 – рецептора к Fc-фрагментам IgG, необходимого для фагоцитоза IgG-опсонизированных патогенов [Asakura et al., 2002]. Гранулоциты с высокой экспрессией CD16 (CD16^{hi}) и средней экспрессией CD16 (CD16^{int}) дифференцированы по степени зрелости и характеризуются разной адгезионной способностью к активированному эндотелию и экстравазации, что определяет их разную активность при воспалении, дополнительно предполагая участие в изменении иммунореактивности при беременности [Boron et al., 2022]. В немногочисленных исследованиях показано, что нарушение субпопуляционного состава CD16^{hi}- и CD16^{int}-нейтрофилов и их функций ассоциировано со спонтанными абортными в ранние сроки беременности [Рапопорт, Курмышкина, Бовин, 2008]. В наших предыдущих исследованиях показано, что при физиологической беременности нарастает доля (CD16^{int}) нейтрофилов в общем пуле гранулоцитов периферической крови, а количество CD16^{hi} гранулоцитов снижается, метаболическая активность CD16^{hi}- и CD16^{int}-нейтрофилов увеличивается к концу беременности [Орлова и др., 2024]. Однако особенности экспрессии CD16 на гранулоцитах низкой плотности и их метаболический статус при физиологической беременности не изучены.

В большинстве работ гранулоциты низкой плотности описываются как избыточно активированные клетки, что предполагает их высокую метаболическую активность [Denny et al., 2010; Carmona-Rivera, Kaplan, 2013; Yang et al., 2019; Ning, Wang, Jin, 2022]. Для большинства клеток иммунной системы глюкоза является основным энергетическим субстратом и поступает в клетку при помощи белков-транспортёров (GLUT-1), а количество и состояние митохондрий отражают активность основных метаболических путей [Stojkov et al., 2022]. Поэтому целью данной работы является изучение экспрессии молекул, характеризующих цитотоксичность (CD16, CD107a), транспорт глюкозы (GLUT-1) и состояние митохондрий (MitoSpy™ Green FM) нейтрофилов низкой плотности и общей фракции гранулоцитов в разные trimestры физиологической беременности.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлась венозная кровь женщин в I и в III trimestрах физиологической беременности (табл. 1). Группу сравнения составили условно-здоровые небеременные женщины в фолликулярной фазе менструального цикла, сравнимые по возрасту с исследуемыми группами. Использовались следующие критерии включения: добровольное информированное согласие на использование биологического материала, наличие одной и более успешных беременностей; отсутствие патологий беременности в прошлом и настоящем; отсутствие острых и хронических заболеваний; отрицание диет, приема контрацептивных, гормональных, противовоспалительных или антибактериальных препаратов. Исследование выполнено в соответствии с этическими стандартами национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. с ее последующими изменениями или сопоставимым нормам этики и одобрено локальным этическим комитетом ИЭГМ УрО РАН (протокол № 16 от 05.06.2022).

Таблица 1

Характеристика участников исследования [Characteristics of study participants]

Исследуемые группы	Количество	Возраст	Срок беременности, недель
Небеременные женщины	6	20.5 (20–27)	-
Беременные, I триместр	7	31 (25–32)	12 (10–12)
Беременные, III триместр	6	29 (25–32)	31 (30–32)

Примечание. Возраст и срок беременности представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей Me(Q1-Q3).

Венозную кровь получали из локтевой вены утром натощак в вакуумные пробирки с этилендиамин-тетрауксусной кислотой в качестве антикоагулянта после 8 ч. голодания. Собранную кровь делили на две равные части. Для анализа нейтрофилов низкой плотности выделяли фракцию мононуклеарных лейкоцитов периферической крови (МНПК). Для этого одну часть крови разводили средой RPMI 1640 в соотношении 1:1, наслаивали на фиколл (1.077 г/см³) и центрифугировали 40 мин при 400 g. МНПК собирали пипетированием с границы раздела фаз, затем ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 2мМ ЭДТА и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), дважды отмывали центрифугированием по 5 мин. при 300 g. Для исследования общего пула гранулоцитов из второй части крови уда-

ляли эритроциты с помощью лизирующего буфера (BioLegend, USA). Окрашивание моноклональными антителами проводили согласно инструкции производителя. Характеристика использованных антител представлена в табл. 2. Фенотип клеток анализировали на проточном цитометре «CytoFlex S» (BeckmanCoulter, США) с использованием программы «CytExpert 2.0» (Beckman Coulter, США). Анализировали не менее 100 000 событий в каждой пробе. Для уменьшения неспецифического связывания и адгезии клеток окрашивание проводили в ФСБ, содержащем 2мМ ЭДТА и 0.1% БСА, без использования консервантов. Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флюоресценции окна использовали соответствующие изотипические и негативные контроли. Стратегия гейтирования представлена на рис. 1.

Таблица 2

Характеристика антител
[Antibodies characteristic]

Антитела	Флюорохром	Клон	Изотип	Производитель
CD3	PE	OKT3	Mouse/IgG2a, κ	BioLegend, USA
CD16	Pacific blue™	3G8	Mouse IgG1, κ	BioLegend, USA
CD107a	APC	H4A3	Mouse IgG1, κ	BioLegend, USA
GLUT-1	PE-Cy5.5	Polyclonal	Rabbit IgG	Biorbyt, Great Britain

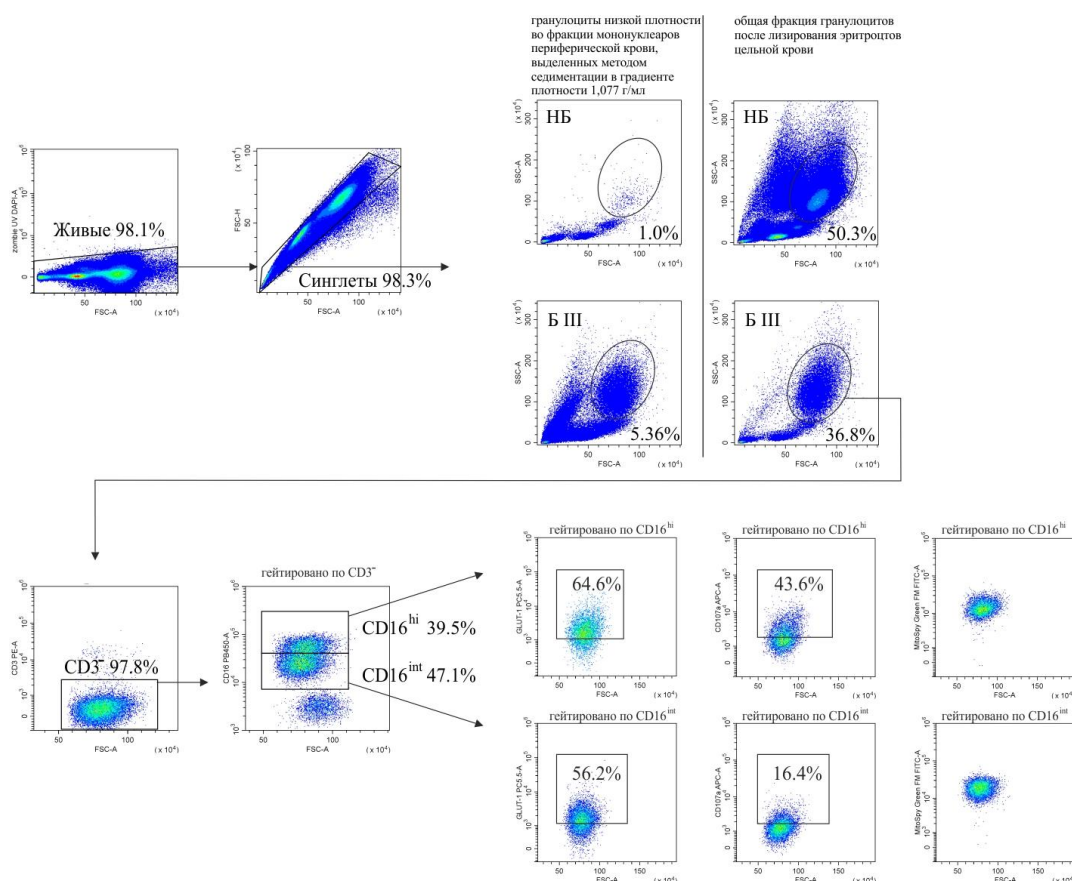


Рис. 1. Стратегия гейтирования гранулоцитов

[Granulocyte gating strategy]

Последовательно: определение региона живых клеток с использованием красителя Zombie UV™; определение одиночных неслипшихся клеток (синглетов) по параметрам площади и высоты прямого светорассеивания (FSC-A/ FSC-H); выделение гранулоцитарного гейта по параметрам площади прямого (FSC-A) и высоты бокового (SSC-H) светорассеивания в периферической крови во фракции мононуклеарных клеток после выделения на градиенты фиколла (нейтрофилы низкой плотности у НБ и в III триместре (Б III) или в общей фракции гранулоцитов периферической крови после лизирования эритроцитов (общая фракция гранулоцитов у НБ и в III триместре (Б III)); определение CD3⁺ клеток в гейте гранулоцитов; выделение CD16^{hi} и CD16^{int} субпопуляций среди CD3⁺CD16⁺ гранулоцитов; оценка экспрессии GLUT-1, CD107a среди CD16^{hi}- и CD16^{int}-клеток; определение включения флюоресцентного красителя MitoSpy™ Green FM в CD16^{hi}- и CD16^{int}-клетки.

Представлены гистограммы одного репрезентативного эксперимента

Статистический анализ проводили с помощью программы Prism v.8.0.1 (Graphpad, США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде медианы (Me), нижних (LQ) и верхних квартилей (UQ). Достоверность различий между группами: небеременные – НБ (группа сравнения); беременные в I триместре (Б I); беременные в III триместре (Б III) определяли с использованием критерия Крускала-Уоллиса для множественных сравнений независимых переменных. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Среди гранулоцитов периферической крови доминирующей популяцией являются нейтрофилы (более 93%) [Кишкун, 2013]. При изучении гранулоцитов низкой плотности во фракции МНПК также показано, что эти клетки относятся к нейтрофильным гранулоцитам [Torell et al., 2023]. В проведенном исследовании показано, что у здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста процент гранулоцитов низкой плотности от фракции МНПК составляет 1.37% (0.96–3.72), а при беременности увеличивается: в I триместре – 5.83% (3.77–21.54; $p < 0,05$ к НБ), в III триместре – 3.21% (0.64–6.99) (рис. 1), что согласуется с работами других авторов [Torell et al., 2023]. У небеременных CD16^{hi}-нейтрофилы являются преобладающей субпопуляцией как в общем пуле гранулоцитов, так и среди клеток низкой плотности (рис. 2). Ранее подобные результаты для общей фракции нейтрофилов описаны и другими авторами для доноров обоих полов [Kamp et al., 2012; Medara et al., 2021; Martin et al., 2022]. Считается, что CD16^{hi}-нейтрофилы являются более зрелыми и проявляют большую цитотоксичность по сравнению с CD16^{int}-нейтрофилами [Kamp et al., 2012]. В динамике беременности соотношение CD16^{hi}/CD16^{int}-клеток меняется аналогичным образом как среди общей фракции нейтрофилов, так и среди нейтрофилов низкой плотности: количество CD16^{hi} – снижается, а CD16^{int}-клеток увеличивается пропорционально сроку беременности (рис. 2). Нарастание пропорции CD16^{int}-клеток в периферической крови на фоне развития нейтрофильного лейкоцитоза, по-видимому, объясняется стимулирующим влиянием гормонов плаценты на миелопоэз и выход менее зрелых форм нейтрофилов в периферическую кровь. Можно полагать, что системное угнетение цитотоксических реакций клеток адаптивного иммунитета, участвующих в антимикробной защите, при беременности компенсируется увеличением количества нейтрофилов, тогда как вопрос о причинах увеличения количества нейтрофилов низкой плотности при физиологической беременности остается открытым [Hassani et al., 2020]. Согласно данным литературы, нейтрофилы низкой плотности включают как незрелые формы, так и зрелые, которые приобретают характеристики данной популяции под влиянием активационных факторов [Hassani et al., 2020]. По-видимому, при беременности увеличение количества нейтрофилов низкой плотности в периферической крови обусловлено стимуляцией миелопоэза гормонами плаценты.

Цитотоксическую активность нейтрофилов оценивали по экспрессии молекулы CD107a (белок мембраны гранул), появление которой на поверхности клетки свидетельствует о ее дегрануляции и выбросе содержимого гранул во внеклеточное пространство. Анализ присутствия CD107a показал, что у небеременных женщин и в I триместре беременности количество CD107a-позитивных клеток не отличалось в субпопуляциях CD16^{hi}- и CD16^{int}-нейтрофилов как в общей фракции, так и среди нейтрофилов низкой плотности (рис. 3). В III триместре беременности процент CD16^{int}-нейтрофилов, экспрессирующих CD107a, достоверно снижался по сравнению с небеременными как в общей фракции, так и среди нейтрофилов низкой плотности. Учитывая преобладание CD16^{int}-нейтрофилов к концу беременности, можно сделать вывод о снижении цитотоксичности как общего пула нейтрофилов периферической крови, так и нейтрофилов низкой плотности в III триместре физиологической беременности. Таким образом, полученные результаты дополняют наше понимание механизмов снижения антимикробной резистентности организма матери, характерное для физиологической беременности.

Известно, что увеличение экспрессии GLUT-1 отражает усиление потребления глюкозы и активации метаболических процессов в клетке [Martin et al., 2022]. Краситель MitoSpy Green может избирательно накапливаться в матриксе митохондрий, где связывается белками [Cottet-Rousselle et al., 2011]. Накопление MitoSpy Green в клетке прямо пропорционально массе и объему митохондриального компартмента, что свидетельствует об усилении биогенеза энергетических органелл [Cottet-Rousselle et al., 2011]. Установлено, что у небеременных CD16^{hi}- и CD16^{int}-нейтрофилы как в общем пуле, так и среди клеток низкой плотности, не отличались по экспрессии GLUT-1 и способности накапливать MitoSpy Green, что свидетельствует об их сходной метаболической активности. В I триместре беременности экспрессия GLUT-1, масса и объем митохондрий достоверно не менялись в сравнении с небеременными женщинами. В III триместре масса и объем митохондрий достоверно увеличивались в CD16^{hi}- и CD16^{int}-нейтрофилах общего пула, тогда как среди гранулоцитов низкой плотности присутствовала подобная тенденция, но она не являлась достоверной (рис. 3B). Таким образом, можно заключить, что метаболическая активность нейтрофилов увеличивается к концу беременности, что, по-видимому, сопряжено с активацией в них синтетических процессов.

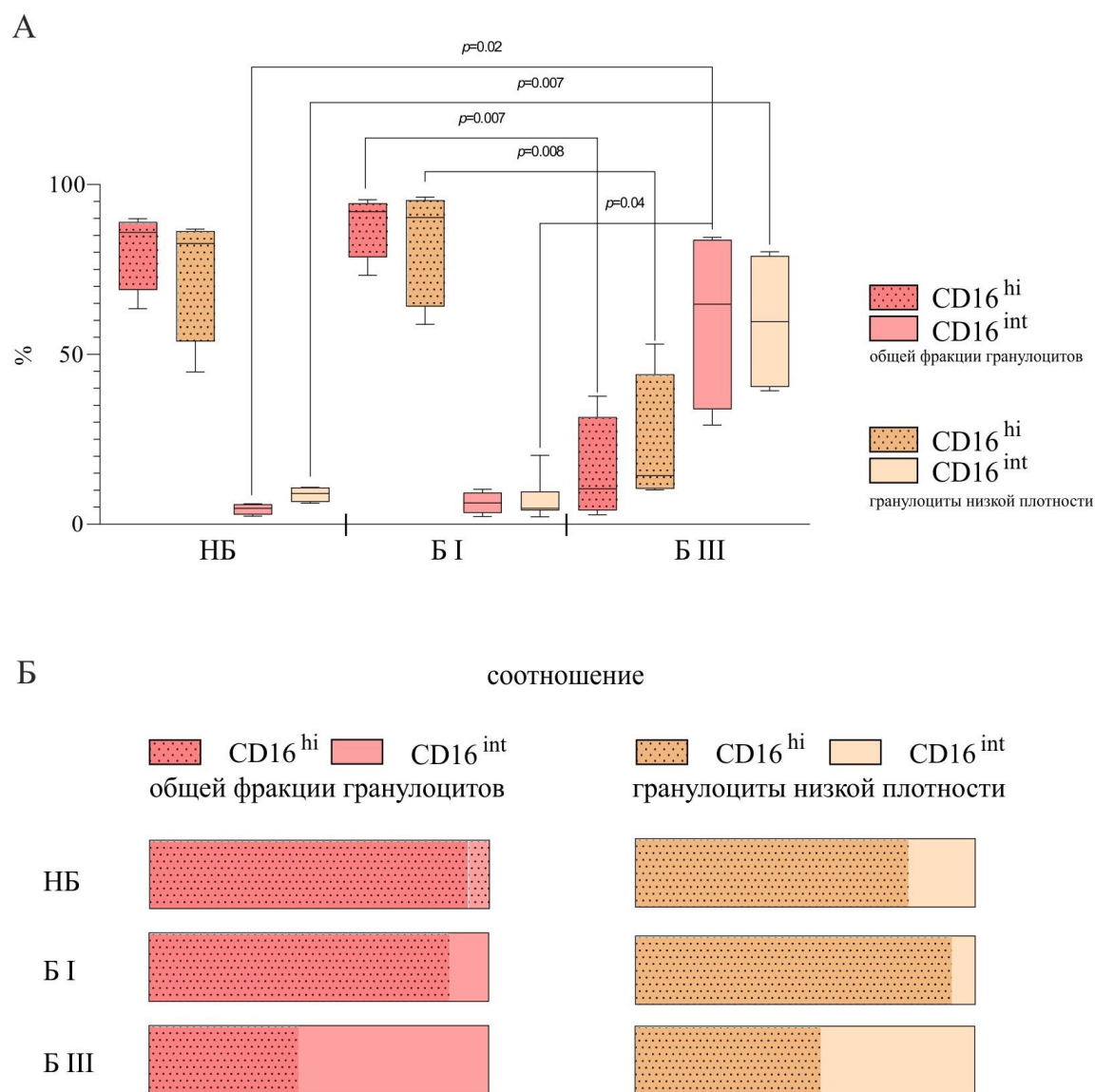


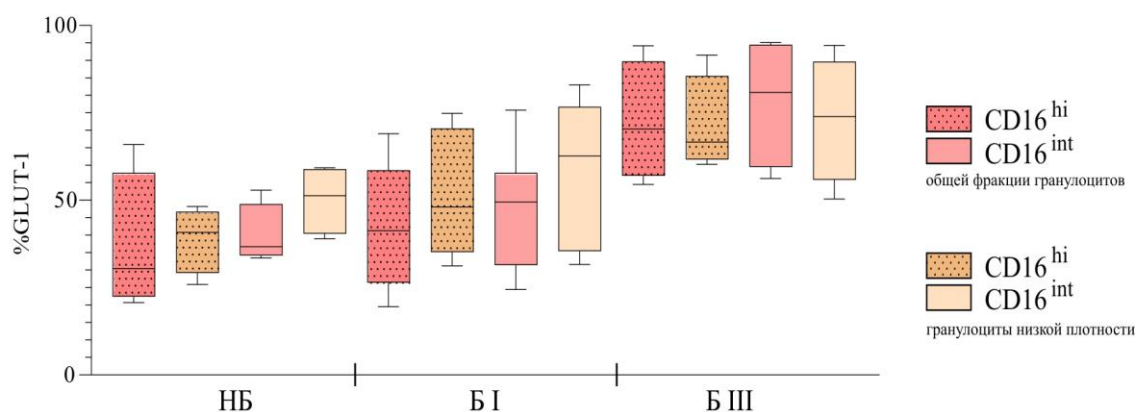
Рис. 2. Процентное содержание (А) и соотношение (Б) $CD16^{hi}$ - и $CD16^{int}$ -нейтрофилов в общей фракции гранулоцитов и среди гранулоцитов низкой плотности у небеременных (НБ), беременных в I (Б I) и III триместрах (Б III).

Данные (А) представлены в виде медианы и межквартильного размаха, Me (Q1-Q3); процентное соотношение $CD16^{hi}/CD16^{int}$ -клеток; значения «р» представлены по критерию Крускала-Уоллиса с апостериорным тестом Данна [Percentage (A) and ratio (B) of $CD16^{hi}$ - and $CD16^{int}$ -neutrophils in the total fraction of granulocytes and among low-density granulocytes in non-pregnant (НБ), pregnant women in I (Б I) and III trimesters (Б III).

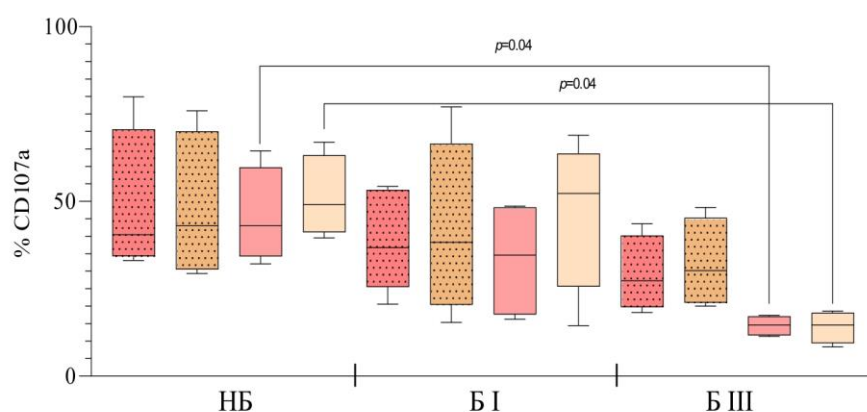
Data (A) are presented in the form of median and interquartile range, Me (Q1-Q3); percentage ratio of $CD16^{hi}/CD16^{int}$ cells; values of "p" are presented according to the Kruskal-Wallis criterion with the posteriori Dunn test]

Согласно данным литературы и нашим ранее проведенным исследованиям, гормоны, продуцируемые плацентой при беременности, оказывают мощные модулирующие эффекты на функциональную активность нейтрофилов периферической крови [Некрасова, Ширшев, 2013; Патурова и др., 2018]. Можно полагать, что выявленные нами функциональные особенности нейтрофилов при беременности также объясняются влиянием гормонов плаценты, поскольку нейтрофилы экспрессируют специфические рецепторы к гормонам беременности [Revelli, Mascobrio, Tesarik, 1998]. Учитывая способность нейтрофилов к инфильтрации тканей матки и участию в иммунном отторжении, модуляция их цитотоксической активности важна не только для обеспечения антимикробной резистентности, но и благополучного течения беременности. Полученные результаты раскрывают новые механизмы регуляции функциональной активности нейтрофилов при беременности.

A



Б



В

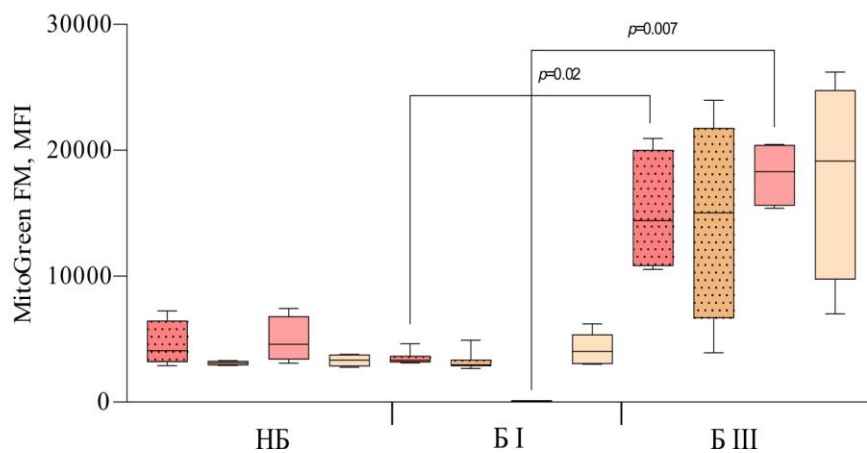


Рис. 3. Процент $CD16^{hi}$ - и $CD16^{int}$ -гранулоцитов, позитивных по экспрессии GLUT-1 (А), CD107a (Б), включению митохондриального зонда MitoSpy Green (В) в общей фракции гранулоцитов и среди гранулоцитов низкой плотности у небеременных (НБ), беременных в I (Б I) и III триместрах (Б III).

Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха, Me (Q1-Q3); (В) по оси ординат представлена медиана интенсивности флуоресценции (MFI, Median Fluorescence Intensity) в клетках, содержащих MitoSpy Green FM; значения «р» представлены по критерию Крускала-Уоллиса

[The percentage of $CD16^{hi}$ - and $CD16^{int}$ -granulocytes positive for the expression of GLUT-1 (A), CD107a (B), the inclusion of MitoSpy Green mitochondrial probe (B) in the total fraction of granulocytes and among low-density granulocytes in non-pregnant (НБ), pregnant women in the I (Б I) and III trimesters (Б III)]

Заключение

Таким образом, при физиологически протекающей беременности в периферической крови увеличивается количество гранулоцитов низкой плотности. В динамике беременности количество CD16^{int}-нейтрофилов нарастает, а CD16^{hi}-нейтрофилов снижается как в общей фракции гранулоцитов, так и среди клеток низкой плотности. Различия между нейтрофилами низкой плотности и общей фракции гранулоцитов выявлены по показателям метаболической активности в III триместре беременности. Также в III триместре беременности CD16^{int}-нейтрофилы характеризуются меньшей цитотоксичностью как в общей фракции гранулоцитов, так и среди клеток низкой плотности по сравнению с CD16^{hi}-нейтрофилами. Полученные результаты важны для понимания механизмов регуляции функций нейтрофилов при беременности и перспективны для направленной модуляции функций нейтрофилов периферической крови.

Список источников

1. Кишкун А.А. Клиническая лабораторная диагностика: учеб. пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 976 с.
2. Некрасова И.В., Ширшев С.В. Женские половые стероидные гормоны в регуляции ферментативной активности нейтрофилов // Доклады Академии наук. 2013. Т. 453, № 6. С. 690.
3. Орлова Е.Г. и др. Метаболические особенности гранулоцитов периферической крови при физиологической беременности // Вестник уральской медицинской академической науки. 2024. Т. 21, № 3. С. 233–241.
4. Патурова И.Г. и др. Негеномное влияние прогестерона на радикальную активность нейтрофилов женщин при беременности, в родах и с угрозой преждевременных родов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2018. № 4. С. 506–514.
5. Потапнев М.П., Гущина Л.М., Мороз Л.А. Фенотипическая и функциональная гетерогенность субпопуляций нейтрофилов в норме и при патологии // Иммунология. 2019. № 5. С. 84–96. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15009.
6. Рапопорт Е.М., Курмышкина О.В., Бовин Н.В. Галектины млекопитающих: структура, углеводная специфичность и функции // Биохимия. 2008. Т. 73, № 4. с. 483–497.
7. Циркин В.И. и др. Роль нейтрофилов в физиологическом течении беременности и родов и некоторых акушерских осложнениях // Вестник Уральской академической науки. 2015. № 4. С. 75–86.
8. Ширшев С.В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий. Екатеринбург, 2009. 582 с.
9. Ширшев С.В., Куклина Е.М., Баженова А.В. Влияние прогестерона на фагоцитарную и окислительную активность моноцитов и нейтрофилов // Вестник Пермского университета. 2008. Вып. 9(25) Биология. С. 87–90.
10. Asakura H. et al. Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9 // J. Immunol. 2002. Vol. 169. P. 5912–5918.
11. 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. Art. 6330.
12. Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Low density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity // Semin. Immunopathol. 2013. Vol. 35, № 4. P. 455–463. DOI: 10.1007/s00281-013-0375-7.
13. Cottet-Rousselle C. et al. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes // Cytometry Part A. 2011. Vol. 79, № 6. P. 405–425. DOI: 10.1002/cyto.a.21061.
14. Deniset J.F., Kubes P. Neutrophil heterogeneity: bona fi de subsets or polarization states? // J. Leuk. Biol. 2018. Vol. 103, № 5. P. 829–838. DOI: 10.1002/JLB.3R10917-361R.
15. Denny M.F. et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs // J. Immunol. 2010. Vol. 184, № 6. P. 3284–3297. DOI: 10.4049/jimmunol.0902199.
16. Hassani M. et al. On the origin of low-density neutrophils // J. Leukoc. Biol. 2020. Vol. 107, № 5. P. 809–818.
17. Kamp V.M. et al. Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion // J. Leukoc. Biol. 2012. Vol. 92, № 5. P. 1011–1020. DOI: 10.1189/jlb.0612273.
18. Martin C. et al. Specific circulating neutrophils subsets are present in clinically stable adults with cystic fibrosis and are further modulated by pulmonary exacerbations // Front. Immunol. 2022. № 13. Art. 1012310. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1012310.
19. Medara N. et al. Peripheral neutrophil phenotypes during management of periodontitis // J. Periodontal Res. 2021. Vol. 56, № 1. P. 58–68. DOI: 10.1111/jre.12793.
20. Ning X., Wang W.M., Jin H.Z. Low-density granulocytes in immune-mediated inflammatory diseases // J. Immunol. Res. 2022. Art. e1622160. DOI: 10.1155/2022/1622160.
21. Revelli A., Mascobrio M., Tesarik J. Monogenetic actions of steroid hormones in reproductive tissues // Endocr. Rev. 1998. Vol. 19, № 3. P. 3–17.

22. Ssemaganda A. et al. Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 2. Art. e85696. DOI: 10.1371/journal.pone.0085696.
23. Stojkov D. et al. Physiological and pathophysiological roles of metabolic pathways for NET formation and other neutrophil functions // Front. Immunol. 2022. № 13. Art. e826515. DOI: 10.3389/fimmu.2022.826515.
24. Torell A. et al. Low-density granulocytes are related to shorter pregnancy duration but not to interferon alpha protein blood levels in systemic lupus erythematosus // Arthritis Res. Ther. 2023. Vol. 25, № 1. Art. 107. DOI: 10.1186/s13075-023-03092-w.
25. Yang P. et al. Different faces for different places: heterogeneity of neutrophil phenotype and function // J. Immunol. Res. 2019. Art. e8016254. DOI: 10.1155/2019/8016254.
26. Ye H. et al. Dysregulated low-density granulocyte contributes to early spontaneous abortion // Front. Immunol. 2023. № 14. Art. e1119756. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1119756.

References

1. Kishkun A.A. *Kliničeskaja laboratornaja diagnostika* [Clinical laboratory diagnostics: a textbook]. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2009. 582 p. (In Russ.).
2. Nekrasova I.V., Shirshov S.V. [Female sex steroid hormones in the regulation of enzymatic activity of neutrophils]. *Doklady Akademii nauk*. No. 6 (2013): pp. 690. (In Russ.).
3. Orlova E.G., Loginova O.A., Gorbunova O.L., Shirshov S.V. [Metabolic features of peripheral blood granulocytes in physiological pregnancy]. *Vestnik ural'skoj medicinskoj akademičeskoj nauki*. No. 3 (2024): pp. 233-241. (In Russ.).
4. Paturova I.G., Polezhaeva T.V., Khudyakov A.N., Solomina O.N., Zaitseva O.O., Bratukhina O.A., Dmitrieva S.L., Tsikin V.I. [The non-genomic effect of progesterone on the radical activity of neutrophils in women during pregnancy, childbirth and with the threat of premature birth]. *Rossijskij fiziologičeskij žurnal im. I.M. Sečenova*. No. 4 (2018): pp. 506-514. (In Russ.).
5. Potapnev M.P., Gushchina L.M., Moroz L.A. [Phenotypic and functional heterogeneity of neutrophil subpopulations in normal and pathological conditions]. *Immunologija*. No. 5 (2019): pp. 84-96. (In Russ.).
6. Rapoport E.M., Kurmyshkina O.V., Bovin N.V. [Mammalian galectins: structure, carbohydrate specificity and functions]. *Biochimija*. No. 4 (2008): pp. 483-497. (In Russ.).
7. Tsirkin V.I., Anisimov K.Yu., Polezhaeva T.V., Zaitseva O.O., Khudyakov A.N., Solomina O.N., Khlybova S.V., Dmitrieva S.L., Popova V.S. [The role of neutrophils in the physiological course of pregnancy and childbirth and some obstetric complications]. *Vestnik Ural'skoj akademičeskoj nauki*. No. 4 (2015): pp. 75-86. (In Russ.).
8. Shirshov S.V. *Immunologija materinsko-fetal'ny'ch vzaimodejstvij* [Immunology of maternal-fetal interactions]. Ekaterinburg, 2009. 582 p. (In Russ.).
9. Shirshov S.V., Kuklina E.M., Bazhenova A.V. [The effect of progesterone on the phagocytic and oxidative activity of monocytes and neutrophils]. *Vestnik Permskogo universiteta*. Iss. 9(25) Biologija (2008): pp. 87-90. (In Russ.).
10. Asakura H., Kashio Y., Nakamura K., Seki M., Dai S., Shirato Y. et al. Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9. *J. Immunol.* V. 169 (2002): pp. 5912-5918.
11. Boron D.G., Swietlicki A., Potograbski M., Kurzawinska G., Wirstlein P., Boron D., Drews K., Seremak-Mrozikiewicz A. 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 (2022). Art. 6330.
12. Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Low density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin. Immunopathol.* V. 35, No. 4 (2013): pp. 455-463. DOI: 10.1007/s00281-013-0375-7.
13. Cottet-Rousselle C., Ronot X., Leverve X., Mayol J.F. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry Part A*. V. 79, No. 6 (2011): pp. 405-425. DOI: 10.1002/cyto.a.21061.
14. Deniset J.F., Kubes P. Neutrophil heterogeneity: bona fi de subsets or polarization states? *J. Leuk. Biol.* V. 103, No. 5 (2018): pp. 829-838. DOI: 10.1002/JLB.3R10917-361R.
15. Denny M.F., Yalavarti S., Zhao V., Thacker S.G., Anderson M., Sandy A.R. et al. A separate group of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus causes vascular damage and synthesizes type I IFN. *Journal of Immunology*. V. 184, No. 6 (2010): pp. 3284-3297. DOI: 10.4049/jimmunol.0902199.
16. Hassani M., Hellebrekers P., Chen N., van Aalst C., Bongers S., Hietbrink F., Koenderman L., Vrisekoop N. On the origin of low-density neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* V. 107, No. 5 (2020): pp.809-818.
17. Kamp V.M., Pillay J., Lammers J.W., Pickkers P., Ulfman L.H., Koenderman L. Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion. *J. Leukoc. Biol.* V. 92, No. 5 (2012): pp. 1011-1020. DOI: 10.1189/jlb.0612273.
18. Martin C., Dhote T., Ladjemi M.Z., Andrieu M., Many S., Karunanithy V. et al. Specific circulating neutrophils subsets are present in clinically stable adults with cystic fibrosis and are further modulated by pulmonary exacerbations. *Front. Immunol.* V. 13 (2022). Art. 1012310. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1012310.

19. Medara N., Lenzo J.C., Walsh K.A., Reynolds E.C., O'Brien-Simpson N.M., Darby I.B. Peripheral neutrophil phenotypes during management of periodontitis. *J. Periodontal Res.* V. 56, No. 1 (2021): pp. 58-68. DOI: 10.1111/jre.12793.
20. Ning X., Wang W.M., Jin H.Z. Low-density granulocytes in immune-mediated inflammatory diseases. *J. Immunol. Res.* (2022). Art. e1622160. DOI: 10.1155/2022/1622160.
21. Revelli A., Mascobrio M., Tesarik J. Monogenetic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr. Rev.* V. 19, No. 3 (1998): pp. 3-17.
22. Ssemaganda A., Kindinger L., Bergin P., Nielsen L., Mpendo J., Ssetaala A. et al. Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies. *PLoS One.* V. 9, No. 2 (2014). Art. e85696. DOI: 10.1371/journal.pone.0085696.
23. Stojkov D., Gigon L., Peng S., Lukowski R., Ruth P., Karaulov A. et al. Physiological and pathophysiological roles of metabolic pathways for NET formation and other neutrophil functions. *Front. Immunol.* V. 13 (2022). Art. e826515. DOI: 10.3389/fimmu.2022.826515.
24. Torell A., Stockfelt M., Larsson G., Blennow K., Zetterberg H., Leonard D. et al. Low-density granulocytes are related to shorter pregnancy duration but not to interferon alpha protein blood levels in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* V. 25, No 1 (2023). Art. 107. DOI: 10.1186/s13075-023-03092-w.
25. Yang P., Li Y., Xie Y., Liu Y. Different faces for different places: heterogeneity of neutrophil phenotype and function. *J. Immunol. Res.* (2019). Art. e8016254. DOI: 10.1155/2019/8016254.
26. Ye H., Li L., Dong Y., Zheng Q., Sha Y., Li L. et al. Dysregulated low-density granulocyte contributes to early spontaneous abortion. *Front. Immunol.* No. 14 (2023). Art e1119756. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1119756.

Статья поступила в редакцию 21.10.2024; одобрена после рецензирования 25.10.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 21.10.2024; approved after reviewing 25.10.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторах

Е. Г. Орлова – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции; доцент кафедры микробиологии и иммунологии;

О. А. Логинова – канд. биол. наук, младший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции;

О. Л. Горбунова – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции;

С. В. Ширшев – д-р мед. наук, заведующий лабораторией иммунорегуляции.

Information about the authors

E. G. Orlova – doctor of biology, leading researcher of laboratory of immunoregulation, associate professor of the department of microbiology and immunology;

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 статьи.

Логинова О. А. – статистическая обработка и графическое представление результатов.

Горбунова О. Л. – оформление статьи, работа с текстом.

Ширшев С. В. – научное руководство, итоговые выводы.

Contribution of the authors:

Orlova E. G. – research concept and writing of the review.

Loginova O. A. – statistical processing and graphical representation of the results.

Gorbunova O. L. – the design of the article, working with the text.

Shirshv S. V. – research supervision, final conclusions.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.



К 100-летию Александра Степановича Уточкина

Виктор Евгеньевич Ефимик^{1✉}, Сергей Леонидович Есюнин²

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

^{1✉} efimik.viktor@mail.ru

² esyunin@psu.ru

PERSONALITIES

On the 100th anniversary of Alexander Stepanovich Utochkin

Viktor E. Efimik^{1✉}, Sergei L. Esyunin²

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

^{1✉} efimik.viktor@mail.ru

² esyunin@psu.ru

В этом году 15 октября исполнилось 100 лет одному из крупных российских систематиков пауков – Александру Степановичу Уточкину.

Родился Александр Степанович в крестьянской семье в селе Канадей Николаевского района Ульяновской области. Как и многие его сверстники, в 1942 г. был призван на фронт Великой Отечественной войны. Участвовал в боях под Вязмой, на Орловско-Курской дуге и под Смоленском, был награжден орденами и медалями. После трех ранений в 1944 г. был направлен на трудовой фронт. Работая на заводе в г. Дзержинске Нижегородской (тогда Горьковской) области, параллельно доучивался в вечерней школе, которую не удалось закончить в тяжелые военные годы.



В 1950 г. Александр Степанович поступил на биологический факультет Пермского университета. С этого времени и до последних дней вся дальнейшая его жизнь была связана с деятельностью университета.

Со студенческих лет Александр Степанович увлекся научной работой. Его учителем и наставником стал всемирно известный ученый, основатель Пермской арахнологической школы Дмитрий Евстратьевич Харитонов (1896–1970). По окончании учебы именно Д.Е. Харитонов пригласил Александра Степановича поступать в аспирантуру, а потом и работать преподавателем на кафедру зоологии беспозвоночных. В 1972 г. он был избран на должность заведующего кафедрой, которой руководил до 1983 г.

В начале своей научной деятельности Александр Степанович занимался изучением биологии пауков-каракуртов, участвуя в довольно опасных экспедициях в советские республики Средней Азии. Затем он переключился на систематику пауков-бокоходов (сем. Thomisidae). По этой теме им выполнен ряд работ, получивших известность как в стране, так и за рубежом. А.С. Уточкин подготовил и успешно защитил в 1964 г. кандидатскую диссертацию на тему «Пауки сем. Xysticidae фауны СССР», которая легла в основу монографии, в которой описано 14 новых для науки видов и представлен определительный ключ 39 видов.

Наряду с таксономическими исследованиями, в результате которых им было описано 26 новых для науки видов, в круг интересов Александра Степановича входили исследования по фауне пауков Уральского региона и прилегающих территорий.

Александр Степанович имел обширные контакты с отечественными и зарубежными специалистами-арахнологами. Многие годы он был главным редактором межвузовских сборников научных трудов, по-

священных результатам исследований паукообразных: «Вопросы арахноэнтомологии», Пермь, 1971, 1977; «Фауна и экология насекомых», Пермь, 1981, 1990; «Фауна и экология паукообразных», Пермь, 1988. Начиная с 1971 г. и до последних дней работал в качестве корреспондента Международного Центра арахнологической документации в Париже (C.I.D.A) и представлял сведения о работах, выполненных в стране. Он оказывал большую консультационную помощь многим отечественным специалистам, вел обширную переписку с зарубежными коллегами. На координационном Всесоюзном совещании арахнологов (Ленинград, 1984 г.) он был избран в состав бюро секции арахнологии при Всесоюзном энтомологическом обществе.

Коллеги-арахнологи увековечили память о пермском арахнологе, назвав в его честь четыре вида пауков: *Ozyptila utotchkini* Marusik, 1990, *Synema utotchkini* Marusik et Logunov, 1995 (Thomisidae) и *Philodromus utotchkini* Marusik, 1991, *Tibellus utotchkini* Ponomarev, 2008 (Philodromidae).

Статья поступила в редакцию 10.11.2024; одобрена после рецензирования 19.11.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 10.11.2024; approved after reviewing 19.11.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторах

В. Е. Ефимик – канд. биол. наук, заведующий кафедрой зоологии беспозвоночных и водной экологии;

С. Л. Есюнин – д-р биол. наук, доцент, профессор кафедры зоологии беспозвоночных и водной экологии.

Information about the authors

V. E. Efimik – candidate of biology, associate professor, Head of the Department of invertebrates Zoology and Aquatic Ecology;

S. L. Esyunin – Doctor of Biology, associate professor, Professor Department of Invertebrate Zoology and Aquatic Ecology.

Вестник Пермского университета.
Серия БИОЛОГИЯ =
2024. Выпуск 4

Bulletin of Perm University.
BIOLOGY
2024. Issue 4

Научное издание

Редактор *А. С. Беляева*

Корректор *Е. Г. Ефимик*

Компьютерная верстка *С. А. Овеснова*

Подписано в печать 26.11.2024. Выход в свет 23.12.2024.
Формат 60×84/8. Усл. печ. л. 13,6. Тираж 28 экз. Заказ № 1868.
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