

ISSN 1997-1389 (Print)  
ISSN 2313-5530 (Online)

**Журнал Сибирского  
федерального университета  
Биология**

**Journal of Siberian  
Federal University  
Biology**

**2024 17 (1)**

ISSN 1997-1389 (Print)  
ISSN 2313-5530 (Online)

2024 17(1)

Издание индексируется Scopus (Elsevier), «Russian Science Citation Index» и «Zoological Record» на платформе «Web of Science» (Clarivate Analytics), Российским индексом научного цитирования (НЭБ), представлено в международных и российских информационных базах: Ulrich's periodicals directory, ProQuest, EBSCO (США), Google Scholar, Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI), DOAJ, КиберЛенинка.

Включено в список Высшей аттестационной комиссии «Рецензируемые научные издания, входящие в международные реферативные базы данных и системы цитирования».

# Журнал Сибирского федерального университета Биология

## Journal of Siberian Federal University Biology

**Журнал Сибирского федерального университета. Биология.**  
**Journal of Siberian Federal University. Biology.**

Учредитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ)

Главный редактор: *М.И. Гладышев*. Редактор *А.В. Прохоренко*.  
Корректор *Т.Е. Бастрыгина*. Компьютерная верстка *Е.В. Гревцовой*

№ 1. 27.03.2024. Индекс: 42325. Тираж: 1000 экз.

Свободная цена

Адрес редакции и издательства: 660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 79, оф. 32-03.

Отпечатано в типографии Издательства БИК СФУ  
660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 82а.

*Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-28725 от 29.06.2007 г.,  
выданное Федеральной службой по надзору в сфере массовых коммуникаций,  
связи и охраны культурного наследия.*

<http://journal.sfu-kras.ru>

Подписано в печать 18.03.2024. Формат 60х90/8. Усл. печ. л. 9,3.

Уч.-изд. л. 8,8. Бумага тип. Печать офсетная. Тираж 1000 экз. Заказ № 21012.

Возрастная маркировка в соответствии с Федеральным законом № 436-ФЗ: 16+

## CHIEF EDITOR

Michail Gladyshev, Corresponding Member of RAS, Professor, Institute of Biophysics SB RAS, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia.

---

## SCIENCE EDITOR

Elena Kravchuk, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

---

## EDITORIAL BOARD

- Sergey Bartsev, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Andrey Degermendzhy, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Nikolay Gaevsky, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- Viktor Glupov, Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russia
- Malcolm Hughes, University of Arizona, Tucson, USA
- Mikhail Karpinsky, Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, Russia
- Valentina Kratasyuk, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- John Lee, University of Georgia, Athens, USA
- Elena Muratova, Institute of Forest SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Vitaliy Semenchenko, Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Belarus
- Nadezhda Sushchik, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Sabu Thomas, Mahatma Gandhi University, Kottayam, India
- Aristidis Tsatsakis, University of Crete, Heraklion, Greece
- Eugene Vaganov, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- Tatiana Volova, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Egor Zadereev, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

## CONTENTS

<b>Lidia V. Kalina, Vladimir I. Kolmakov, Ludmila I. Verigo, Anna I. Kartavtzeva and Svetlana N. Chernyakova</b> Biological and Medical Aspects of Training and Competition Activity in Sledge Hockey.....	5
<b>Alexandra V. Vladimirova, Anastasiya V. Murueva, Anna M. Shershneva, Svetlana V. Prudnikova, Alexander V. Shabanov and Ekaterina I. Shishatskaya</b> Biocompatible Systems for Controlled Delivery of Antiseptics for Topical Application.....	19
<b>Anna A. Timofeeva, Artyom V. Minin, Marina L. Bakanova, Yana A. Zakharova, Anastasiya V. Torgunakova, Alexandr Y. Prosekov, Ruslan A. Titov and Andrey N. Glushkov</b> Polymorphism of Genes Encoding DNA Repair Enzymes in Coal Mine Workers with Lung Cancer.....	33
<b>Olga Yu. Kiryanova, Azat R. Kuluev, Irek M. Gubaydullin, Bulat R. Kuluev, Alexey V. Chemeris</b> Virtual <i>In Silico</i> PCR in Two-Dimensional Format as a Tool for Elucidating Phylogenetic Relationship in Allopolyploid Forms with Wheats and Their Wild Relatives <i>Aegilops</i> Used as an Example .....	45
<b>Tatiana Yu. Korshunova, Elena V. Kuzina, Milyausha G. Iskuzhina, Svetlana R. Mukhamatdyarova and Yuliyana Yu. Sharipova</b> Oil-Degrading Microorganisms of the Genus <i>Pseudomonas</i> with Resistance to Additional Pollutants and Phytostimulating Activity as Promising Agents of Environmental Biotechnology.....	64
<b>Tatyana O. Azarnova, Alexandra M. Rezykh, Ivan I. Kochish and Inessa S. Lugovaya</b> Lipid Peroxidation Dynamics in Chicken Embryos under Industrial Incubation Conditions with Transovarial Use of Ferulic Acid.....	82
<b>Olga N. Sitnikova, Vitaliy A. Zaitsev and Marina V. Sirotina</b> Formation of the Behavior in Domesticated Moose ( <i>Alces alces</i> L., 1758) during the First Two Years of Life .....	95

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Л.В. Калина, В.И. Колмаков, Л.И. Вериги, А.И. Картавцева, С.Н. Чернякова</b> Биолого-медицинские аспекты тренировочной и соревновательной деятельности в следж-хоккее.....	5
<b>А.В. Владимирова, А.В. Муруева, А.М. Шершнева, С.В. Прудникова, А.В. Шабанов, Е.И. Шишацкая</b> Биосовместимые системы для контролируемой доставки антисептиков для местного применения .....	19
<b>А.А. Тимофеева, А.В. Минин, М.Л. Баканова, Я.А. Захарова, А.В. Торгунакова, А.Ю. Просеков, Р.А. Титов, А.Н. Глушков</b> Полиморфизм генов ферментов репарации ДНК у работников угольных шахт, больных раком легкого .....	33
<b>О.Ю. Кирьянова, А.Р. Кудуев, И.М. Губайдуллин, Б.Р. Кудуев, А.В. Чемерис</b> Виртуальная <i>in silico</i> ПЦР в двумерном формате как инструмент для выяснения филогенетического родства у аллополиплоидных форм на примере пшениц и их диких сородичей эгилопсов .....	45
<b>Т.Ю. Коршунова, Е.В. Кузина, М.Г. Искужина, С.Р. Мухаматдьярова, Ю.Ю. Шарипова</b> Микроорганизмы-нефтедеструкторы рода <i>Pseudomonas</i> с устойчивостью к дополнительным поллютантам и фитостимулирующей активностью как перспективные агенты экобиотехнологии .....	64
<b>Т.О. Азарнова, А.М. Резвых, И.И. Кочиш, И.С. Луговая</b> Особенности динамики липопероксидации у эмбрионов кур в условиях промышленной инкубации при трансвариальном использовании феруловой кислоты.....	82
<b>О.Н. Ситникова, В.А. Зайцев, М.В. Сиротина</b> Формирование поведения одомашниваемых лосей ( <i>Alces alces</i> L., 1758) до двух лет жизни.....	95

EDN: QCDDVX

УДК 612:376.22

## Biological and Medical Aspects of Training and Competition Activity in Sledge Hockey

**Lidia V. Kalina<sup>a, b</sup>,**  
**Vladimir I. Kolmakov<sup>\*a, c</sup>, Ludmila I. Verigo<sup>a</sup>,**  
**Anna I. Kartavtzeva<sup>a</sup> and Svetlana N. Chernyakova<sup>a</sup>**  
*<sup>a</sup>Siberian Federal University*  
*<sup>b</sup>Sports Training Center*  
*<sup>c</sup>Institute of Biophysics SB RAS,*  
*Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”*  
*Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 28.12.2023, received in revised form 29.02.2024, accepted 05.03.2024

**Abstract.** Sledge hockey offers a rich context for gaining multiple physical and social health benefits to athletes with physical disabilities. Sledge hockey technologies are considered an effective means of comprehensive rehabilitation and socialization of military personnel injured in combat. The review is aimed at analyzing and systematizing current views on physiological, biochemical, biomechanical, and medical aspects of training and competition activity in sledge hockey. Motor activity characteristics of sledge hockey players are considered. Physiological and medical risk factors for athletes involved in sledge hockey are identified. It is concluded that further search for new effective models of training in sledge hockey for athletes with disabilities is needed. The review may be useful for social services, public organizations, coaches, and managers in the field of adaptive physical culture and sports.

**Keywords:** sledge hockey, muscles of the upper limbs, biomechanics of movements, sports injuries, training activities.

Citation: Kalina L. V., Kolmakov V. I., Verigo L. I., Kartavtzeva A. I., Chernyakova S. N. Biological and medical aspects of training and competition activity in sledge hockey. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(1), 5–18. EDN: QCDDVX



© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: [vkolmakov@sfu-kras.ru](mailto:vkolmakov@sfu-kras.ru)

ORCID: 0009-0000-1206-160X (Kalina L.); 0000-0002-9643-609X (Kolmakov V.); 0009-0009-7213-0465 (Verigo L.); 0009-0005-2296-8033 (Kartavtzeva A.); 0009-0001-5742-1987 (Chernyakova S.)

## Биолого-медицинские аспекты тренировочной и соревновательной деятельности в следж-хоккее

Л. В. Калина<sup>а, б</sup>, В. И. Колмаков<sup>а, в</sup>,  
Л. И. Веригο<sup>а</sup>, А. И. Картавцева<sup>а</sup>, С. Н. Чернякова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Сибирский федеральный университет

<sup>б</sup>Центр спортивной подготовки

<sup>в</sup>Институт биофизики СО РАН

ФИЦ “Красноярский научный центр СО РАН”

Российская Федерация, Красноярск

**Аннотация.** Следж-хоккей – один из зимних командных видов адаптивного спорта, способствующий укреплению здоровья и повышению качества жизни людей с ограниченными возможностями. В последнее время технологии следж-хоккея рассматриваются как эффективное средство комплексной реабилитации и социализации раненых и травмированных военнослужащих, пострадавших в боевых действиях. Цель настоящего обзора – проанализировать и систематизировать современные представления о физиолого-биохимических, биомеханических и медицинских аспектах тренировочной и соревновательной деятельности в следж-хоккее. Рассмотрены особенности двигательной активности следж-хоккеистов. Определены физиологические и медицинские факторы риска для спортсменов, занимающихся следж-хоккеем. Показано, что для спортсменов с ограниченными возможностями необходимо продолжать поиск новых эффективных моделей тренировочной деятельности в следж-хоккее. Представленная в данной статье информация может быть полезна для государственных социальных служб, общественных организаций, тренеров и менеджеров в области адаптивной физической культуры и спорта.

**Ключевые слова:** следж-хоккей, мышцы верхних конечностей, биомеханика движений, спортивные травмы, тренировочная деятельность.

Цитирование: Калина Л. В. Биолого-медицинские аспекты тренировочной и соревновательной деятельности в следж-хоккее / Л. В. Калина, В. И. Колмаков, Л. И. Веригο, А. И. Картавцева, С. Н. Чернякова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(1). С. 5–18. EDN: QCDDVX

### Введение

Рост инвалидности среди населения планеты – глобальная общемировая проблема. В настоящее время в мире около 1,5 млрд человек живут с физическими, ментальными и коммуникативными нарушениями (Martin Ginis et al., 2021) и примерно 12 % из них на системной основе более пяти раз в неделю занимаются адаптивной физической культурой,

в том числе различными видами адаптивного спорта (Smith et al., 2019). Известно, что такие регулярные занятия не только способствуют укреплению здоровья, снижению уровня заболеваемости и смертности людей с ограниченными возможностями, но и сокращению вероятности наступления неблагоприятных вторичных последствий от малоподвижного образа жизни и даже восстановлению утра-

ченных функций (Diaz et al., 2019). Более того, адаптивный спорт способствует социализации и профессиональному трудоустройству людей с инвалидностью (McKinnon et al., 2022; Varahra et al., 2022), а также выступает одним из факторов социально-экономического развития отдельных территорий и стран (Declerck et al., 2019). Однако самое ценное приобретение от вовлеченности в спорт – это обретение надежды и нового смысла жизни для травмированного или больного человека (Busanich, McAfee, 2023). Неслучайно, в последнее время во многих странах мира наблюдается активное развитие адаптивного спорта.

Следж-хоккей (от английского *sledge hockey*) – это адаптированная версия хоккея на льду (хоккей с шайбой), предназначенная для спортсменов с ограниченными физическими возможностями нижней части тела, связанными с травмами спинного мозга, церебральным параличом или потерей конечностей, которые не могут кататься на коньках в положении стоя. Матч в следж-хоккее состоит из трех периодов по пятнадцать минут и проходит на ледовой площадке обычных размеров для хоккея с шайбой. Следж-хоккеисты находятся в санях с зафиксированным положением ступней, лодыжек, коленей и бедер и в каждой руке имеют по модифицированной хоккейной клюшке, которые используются для отталкивания ото льда и перемещения по площадке, а также для управления шайбой. На постоянной основе данным видом адаптивного спорта занимаются профессиональные спортсмены и любители, имеющие врожденные или приобретенные заболевания, а также получившие травмы или увечья в природных катастрофах, военных конфликтах, бытовых и производственных авариях. В последнее время следж-хоккей рассматривается как эффективное средство комплексной реабилитации и социализации раненых и травмированных военнослужащих,

пострадавших в военных конфликтах (Кононов и др., 2023; Колмаков и др., 2024).

С ростом популярности и значимости в общественной жизни этой командной игры важную роль приобретает понимание и нахождение научно-обоснованных решений некоторых биолого-медицинских проблем, связанных с развитием следж-хоккея. Спортсмены и их родственники, тренеры, менеджеры, специалисты, общественность должны иметь представление не только о пользе занятий следж-хоккеем, но и возможностях и ограничениях для игроков с поражением нижней части тела, а также травматической опасности и рисках этой спортивной игры (Oh et al., 2019). В интересах дальнейшего прогресса следж-хоккея в настоящем обзоре предпринята попытка проанализировать и систематизировать современные представления о физиолого-биохимических, биомеханических и медицинских аспектах, сопровождающих развитие данного вида адаптивного спорта.

#### **Физиолого-биохимические и биомеханические исследования в следж-хоккее**

Эволюция человечества неразрывно связана с приобретением прямоходящего двуногого бега, позволяющего добывать источники пищи с высоким содержанием белка, необходимого для развития мускулатуры и мозга (Raichlen, Alexander, 2017). В результате коэволюционного развития скелетных мышц, дыхательной и сердечно-сосудистой системы, процесса обмена веществ, у человека сформировался энергетически эффективный способ прямоходящего перемещения за счет передвижения нижних конечностей (Furrer et al., 2023). Примечательно, что такая эволюционная адаптация имеет важные современные последствия для достижения высоких результатов в тех видах спорта, где перемещение спортсменов происходит в основном за счет бега или ходьбы. Оче-

видно, что в тренировочной и соревновательной деятельности в следж-хоккее следует учитывать особенности физиолого-биохимических и биомеханических процессов, связанных с использованием для передвижения мышц верхних конечностей и спины, которые эволюционно предназначены для выполнения вспомогательной функции при прямоходящем перемещении у человека.

Как правило, в следж-хоккее принято использовать традиционную циклическую (периодическую) схему тренировок, имеющую физиолого-биохимическое обоснование и направленную на достижение максимальной готовности к определенным соревнованиям (Franca et al., 2022). Однако известно, что в процессе двигательной активности обмен газов и метаболитов между кровью и мышечной тканью у следж-хоккеистов происходит медленнее, чем у хоккеистов, перемещающихся по площадке за счет активных движений нижних конечностей. Согласно исследованиям (Lund Ohlsson, Laaksonen, 2017), кардиореспираторная дыхательная эффективность у спортсменов в положении сидя достоверно ниже, чем стоя. Например, пиковое потребление кислорода ниже при физических упражнениях на верхнюю часть тела, чем на нижнюю часть тела (Baumgart et al., 2018). Верхние конечности человека характеризуются меньшей мышечной массой и капилляризацией скелетных мышц, по сравнению с нижними конечностями. Следовательно, одна из целей физической подготовки следж-хоккеистов – это увеличение силы и улучшение капилляризации скелетных мышц пояса верхних конечностей (Leuchtmann et al., 2020).

Следж-хоккеисту необходимо умело управлять двумя модифицированными клюшками и собственными движениями по поверхности льда с постоянной сменой направления движения за счет верхней части тела. В исследованиях

(Sandbakk et al., 2014a) для игроков профессионального уровня с целью развития мускулатуры плечевого пояса, спины и брюшного пресса предлагается использовать шестинедельные силовые интенсивные тренировки с отягощениями, включающими различные виды тяги (на скамье, вниз, вверх, вперед) с применением линейных энкодеров и жима штанги лежа. Известно, что упражнения с отягощением способствуют мышечной гипертрофии и соответствующему увеличению силы (Hendrickse et al., 2021). В тренировочном процессе функцию утяжелителей может выполнять так называемое интеллектуальное сопротивление, осуществляемое за счет прикрепленных к саням электромагнитных двигателей в сочетании с дисплеем, позволяющим в реальном времени дозировать физические нагрузки (Goldman et al., 2022).

В ходе матча по следж-хоккею игрок осуществляет многократные резкие высокоинтенсивные ускорения и остановки, при которых аэробный метаболизм не может удовлетворить потребности организма в АТФ. Из-за ограничений спортсменов традиционные тренировки с помощью беговой дорожки или езды на велотренажере невозможны. Поэтому в тренировках по следж-хоккею часто применяются методы повторных ускорений на льду с короткими интервалами для восстановления, приближенные к реальным соревнованиям (Sandbakk et al., 2015). В исследованиях (Sandbakk et al., 2014b) было установлено, что даже у хорошо тренированных следж-хоккеистов происходило снижение скорости на 7 % в течение восьми ускорений продолжительностью восемь секунд при возрастании частоты сердечных сокращений и уровня лактата в крови. Поэтому для увеличения мощности анаэробного метаболизма следж-хоккеисту необходимы так называемые интервальные тренировки с повторными ускорениями и короткими периодами отдыха (Rosso et al., 2020). В результате подобных тренирово-

вок происходит физиологическая клеточная адаптация в организме спортсмена к усилению выработки энергии в результате анаэробных реакций распада мышечного гликогена и фосфокреатина посредством активизации работы ферментов, например, фосфофруктокиназы и миокиназы (Spriet, 2022; Egan, Sharples, 2023).

Тренировки с отягощением также могут способствовать развитию скоростных качеств следж-хоккеистов. На примере норвежских следж-хоккеистов было показано, что после шестинедельного выполнения упражнений, требующих применения силы против сопротивления наблюдается не только достоверный прирост в силе от 4 до 8 %, но и в среднем на 2–3 % сокращается время преодоления тридцатиметровой дистанции по льду на санях (Sandbakk et al., 2014b). То есть существует тесная связь между развитием мускулатуры верхней части тела и способностью следж-хоккеиста с высокой частотой производить толчок модифицированными клюшками двумя руками (Skovereng et al., 2013).

Тренировка выносливости особенно важна для игроков следж-хоккея, так как у них быстрее наступает мышечная усталость, чем у хоккеистов. Под усталостью понимается неспособность мышц поддерживать заданный уровень силы во время выполнения физических упражнений (Tornero-Aguilera et al., 2022). Повышенная усталость следж-хоккеистов связана не только с более медленным кислородным обменом при физических нагрузках в мышцах рук и спины, чем в крупных мышцах ног хоккеистов, но и со значительно более продолжительным временем нахождения на площадке в следж-хоккее (так называемые смены игроков). Упражнения на выносливость вызывают физиологическую адаптацию организма к увеличению окислительной способности мышц (D'Angelo, Rosa, 2020) и сократительной экспрессии мышечных белков

(Hawley et al., 2018). Однако важно регулировать интенсивность и продолжительность тренировки, чтобы предотвратить наступление нервно-мышечного переутомления спортсмена (O'Leary et al., 2017). Принято выделять “периферическую” утомляемость, определяемую нарушением функции мышц, и “центральную” утомляемость, связанную со снижением способности нервной системы активировать мышцы (Weavil, Amann, 2019). Одна из основных причин центрального утомления мышц – это нарушение передачи возбуждения в межнейронных синапсах из-за уменьшения запасов медиатора и истощения ресурсов нейрона (Di Domenico et al., 2022).

Так как высокоинтенсивные физические нагрузки сопровождаются метаболическими и гематологическими изменениями в организме следж-хоккеистов, то коррективы в план тренировок часто вносятся на основании результатов биохимических исследований крови. Например, в статье С. В. Нотовой с соавторами (Нотова и др., 2018) представлены данные биохимических показателей крови следж-хоккеистов в возрасте 20–40 лет. Оказалось, что высокоинтенсивные тренировки способствуют снижению содержания холестерина, альбумина, креатинина, но приводят к возрастанию глюкозы за счет мобилизации гликогена. В литературе имеются данные (Flockhart, Larsen, 2023) о том, что связь уровня глюкозы в крови с интенсивными физическими нагрузками имеет сложный характер и требует дальнейшего изучения.

Известно, что биомеханические исследования важны для оценки физических возможностей и спортивных достижений человека с ограничениями (Gal, 2017; Morrien et al., 2017). Биомеханика движений следж-хоккеиста определяется нахождением игрока в санях, что оказывает влияние на физиологию движений и оксигенацию мышц (Pellegrini et al., 2023). Например, для выполнения маневрирования

на площадке игроку требуется экстремальное сгибание и разгибание плеча и (или) запястья, отведение и вращение тела. Результаты экспериментов, проведенных с профессиональными игроками из канадской лиги Онтарио (Worden-Rogers, 2012), позволили определить оптимальное положение следж-хоккеиста в санях на основе биомеханического анализа угла наклона тела, высоты сидения и устойчивости. Для повышения качества игры следж-хоккеистов биомеханический анализ применяется в сочетании с компьютерным моделированием и алгоритмической оптимизацией (Naveed, 2023). Подобные исследования особенно актуальны при внедрении новых технологий для производства и модернизации адаптивного оборудования, особенно хоккейных саней с полозьями и пары клюшек для следж-хоккея. Например, Liang (2020) предложил использовать новый прототип клюшек, позволяющий бросать шайбу со скоростью на 10 % выше, чем имеющимися в продаже клюшками.

Таким образом, физиолого-биохимические и биомеханические особенности спортсменов, занимающихся следж-хоккеем, не позволяют “автоматически” применять эффективные модели тренировочной деятельности, принятые в хоккее с шайбой (Blauwet et al., 2019). Поэтому для следж-хоккеистов разрабатываются специфические коллективные и индивидуальные средства и методы спортивной подготовки (Baumgart, Sandbakk, 2016; Иванов и др., 2018).

### **Физиологические и медицинские факторы риска в следж-хоккее**

Следж-хоккей, как и другие командные адаптивные виды спорта, способствует улучшению общего состояния здоровья и качества жизни спортсменов (Diaz et al., 2019). Однако в следж-хоккее существуют физиологические и медицинские факторы риска, препятствующие

или затрудняющие спортсменам с ограниченными физическими возможностями участвовать в соревнованиях (Napolitano et al., 2021). К таковым относятся нарушение режима дня и питания вследствие длительных многочасовых поездок к местам проведения матчей, обострение хронических заболеваний и риск получения травм при высоких физических соревновательных нагрузках (Luijten et al., 2021), опасность заболевания респираторными инфекциями (Steffen et al., 2022), условия окружающей среды (Ripat et al., 2020). Разнообразные нарушения здоровья и болезни спортсменов, многие из которых являются тяжелыми и прогрессирующими, требуют высокого уровня медицинского сопровождения с проведением частых медицинских процедур во внедомашней обстановке (Ralph et al., 2022). Например, из-за гемодинамических изменений вследствие травм спинного мозга или ампутации конечностей у спортсменов с ограничениями в движении наблюдается повышенный риск сердечно-сосудистых заболеваний (Sawczuk et al., 2023), а также нарушения мочеполовой и желудочно-кишечной функции (Dutton, 2019).

У следж-хоккеистов с травмами спинного мозга и ампутациями нарушена функция симпатической нервной системы, регулирующая термогенез, поэтому они подвержены тепловому или холодовому стрессу. Например, при высокоинтенсивных физических упражнениях у следж-хоккеистов наблюдается более высокое поднятие температуры тела, чем у спортсменов без физических ограничений (Jung et al., 2017). Поскольку у следж-хоккеистов снижена способность адаптации к тепловому стрессу, рекомендовано обильное употребление воды перед началом и в течение матча. С другой стороны, следж-хоккеисты играют в прохладных условиях, что несет потенциальную опасность переохлаждения. В ходе матча игроки могут испытывать признаки наступления вегетативной

дисфункции, симптомы которой могут проявляться через головную боль, чрезмерную потливость, покраснение лица, расширение зрачков (Zapf, Joуse, 2018). Постоянное воздействие низких или высоких температур окружающей среды при физических нагрузках может вызывать кровотечение, аритмию, метаболический ацидоз и гипертермию (Song et al., 2015).

Картирование давления на разные участки тела в положении сидя для следж-хоккеистов было проведено в работе (Berthold et al., 2013). Оказалось, что систематическое занятие следж-хоккеем может подвергать игроков риску образования пролежней, или повреждения тканей в результате длительного или интенсивного давления. Для снижения этих рисков, необходим поиск новых конструкций санок и расположения подушек для игры в следж-хоккей. Исследование, проведенное Darragh с соавторами (2016), показало, что следж-хоккеисты испытывают более высокое давление в положении сидя, по сравнению с контрольной группой, составленной из спортсменов без физических ограничений. Средний уровень зарегистрированного давления у следж-хоккеистов превышал клинически приемлемое давление в положении сидя на нижние участки тела спортсмена, что указывает на высокий риск образования язв на коже.

Матчи по следж-хоккею проходят на высоких скоростях и в жесткой силовой борьбе, что может приводить к травматизму игроков (Sobry et al., 2021). При нахождении сидя в санях игрок перемещается за счет усиленной работы только верхних конечностей и плечевого пояса, что приводит к перегрузкам и увеличению риска получения травм. Разнообразные нарушения здоровья спортсменов-паралимпийцев предъявляют высокие требования к профилактике травматизма. Установлено (Derman et al., 2016), что для зимних Паралимпиад характерна более высокая частота травм, чем для летних Пара-

лимпийских Игр. Недавно были опубликованы исследования сравнительного мониторинга здоровья норвежских спортсменов, принимавших участие в зимних Паралимпийских и Олимпийских играх в период с 2012 по 2020 год (Clarsen et al., 2021). Оказалось, что характер и частота травм у паралимпийцев примерно совпадает с таковыми у олимпийцев. Следж-хоккеисты, как и хоккеисты, страдают от острых и хронических растяжений, переломов, рваных ран. Наиболее распространенные тяжелые травмы в следж-хоккее – это сотрясение головного мозга (36,2 %) и переломы костей (8,5 %) (Sobry et al., 2022). Наиболее часто травмируемые места – голова (34,0 %), запястье и кисти рук (14,8 %), плечо (10,6 %). Иногда имеются случаи травматизма других частей тела, в том числе мягких тканей бедер или голеней (Hawkeswood et al., 2011).

На международных соревнованиях, таких как чемпионаты мира и Европы, Паралимпийские игры, травматизм в следж-хоккее значительно выше, чем на соревнованиях по другим адаптивным видам спорта. Например, на Паралимпиаде в Ванкувере (2010 г.) частота травм в следж-хоккее составила 34 %, горных лыжах – 22 %, керлинге на колясках – 18 %, лыжных гонках – 19 % (Webborn et al., 2012). В статье (Song et al., 2020) следж-хоккей по числу спортивных травм, наряду с горнолыжным спортом, определен как самый рискованный вид адаптивного спорта. По данным (Wu et al., 2022), на Паралимпиадах частота получения травм в следж-хоккее была в среднем в 2,2 раза выше, чем в горнолыжном спорте, в котором спортсмены также имеют высокую вероятность получения травм. Для спортсменов, выступающих на любительском уровне, риск и характер получения травм примерно такой же, как и профессиональных следж-хоккеистов (Soo Hoo et al., 2019). Для снижения травматизма необходима разработка и производство удобной защитной

экипировки и одежды для следж-хоккеистов. В отдельных странах (Park et al., 2016) проводятся исследования по заказу государства по поиску инновационных решений в защитной экипировке и одежде для следж-хоккея с учетом биомеханических и физиологических особенностей спортсменов, но пока данная проблема продолжает оставаться актуальной.

Известно, что спортсмены-колясочники, длительно использующие мышцы пояса верхних конечностей для передвижения на механических колясках с ручным приводом, подвержены хроническим болям в плечевом поясе (Heyward et al., 2017; Mason et al., 2020). Возникает вопрос: усиливаются или нет болевые симптомы в плечевом поясе систематически занимающихся следж-хоккеем инвалидов-колясочников, которые в повседневной жизни перемещаются на колясках с ручным приводом? В статье (Spangenberg et al., 2021) для спортсменов элитного уровня показана связь возникновения болей плечевого пояса с избыточным весом, возрастом и длительностью применения коляски на ручном приводе. Однако, по мнению данных авторов, в настоящее время нет достоверных результатов исследований о том, что занятия следж-хоккеем приводят к усилению хронических болей в плечевом поясе.

Таким образом, для снижения уровня травматизма в следж-хоккее предлагается, во-первых, продолжить разработку эффективной защитной экипировки и поиск новых методик тренировок, обеспечивающих укрепление физического здоровья спортсменов. Во-вторых, сформировать программы профилактики и лечения травм на основе современных исследований биомеханики двигательной деятельности в следж-хоккее (Fairbairn, Nuxel Bliven, 2019). В-третьих, реализовывать стратегию профилактики травматизма в следж-хоккее с привлечением образовательных программ

для тренеров, игроков, родителей. Реализация образовательных программ по профилактике травматизма должна быть основана на комплексном и междисциплинарном подходе (Oh et al., 2019). В целом фундаментальное понимание физиологических и медицинских рисков имеет первостепенное значение для обеспечения безопасного следж-хоккея и защиты здоровья спортсменов.

### **Методические ограничения биолого-медицинских исследований следж-хоккеистов**

В доступной нам литературе указывается на острую необходимость проведения биолого-медицинских исследований следж-хоккеистов (Fagher et al., 2022). Иначе может быть поставлена под сомнение эффективность и целесообразность нынешних тренировочных практик (Dehghansai et al., 2017). Однако получение достоверных результатов остается сложной задачей из-за ограниченности выборки в сочетании с разнообразием нозологических групп физических и ментальных ограничений у игроков. Также некорректно экстраполировать результаты, полученные для игроков в хоккее на льду, на следж-хоккеистов. Поэтому для формулирования общих заключений и выводов для следж-хоккея следует накапливать и анализировать объединенные данные, полученные разными авторами в исследованиях на относительно небольших выборках.

Возможности применения общепринятых методов контроля при исследованиях функционального состояния следж-хоккеистов с поражением нижних конечностей весьма ограничены. В доступной нам литературе представлены некоторые примеры использования технических средств и систем. Например, многомерного видеоанализа и фотоэлементов (Sandbakk et al., 2014b), системы D&K-TEST для развития скоростно-силовых качеств (Лазаренко, Каман-

цев, 2017), системы Firstbeat для мониторинга показателей физической работоспособности и функциональных возможностей (Баряев и др., 2020). Некоторые авторы (Лазаренко, Кожевников, 2023) предлагают применять методы исследований, не требующие измерений при активном движении следж-хоккеиста. В целом поиск адекватных мониторинговых тест-систем – важнейшая задача на пути прогресса в решении биолого-медицинских проблем в следж-хоккее.

### Заключение

В следж-хоккее пропагандируется гуманистическая модель развития личности, при которой одинаково ценятся спортивные достижения, укрепление здоровья и благополучие спортсменов. В регулярных занятиях следж-хоккеем необходимо находить баланс между улучшением спортивных результатов и повышенным риском травм и заболеваний

для лиц с различными нозологическими нарушениями. Поэтому тренировочную и спортивную деятельность в следж-хоккее следует рассматривать с учетом различных биолого-медицинских аспектов, таких как физиологическая адаптация, биомеханические особенности движения, эпидемиологическая ситуация и др. Особое внимание следует уделить физиолого-биохимическому обоснованию тренировочной деятельности следж-хоккеистов, которая должна быть основана на фундаментальной концепции гомеостатической регуляции, стрессовой адаптации и принципа суперкомпенсации. Предлагаемые рекомендации направлены на дальнейшее развитие следж-хоккея – этой популярной среди болельщиков спортивной командной игры, выполняющей благородную функцию социализации и повышения качества жизни людей с ограниченными физическими возможностями.

### Список литературы / References

Баряев А. А., Иванов А. В., Арансон М. В. (2020) Контроль функционального состояния юных спортсменов в хоккее-следж. *Теория и практика физической культуры*, 7: 45–47 [Baryayev A. A., Ivanov A. V., Aranson M. V. (2020) Functionality monitoring in youth sledge hockey. *Theory and Practice of Physical Culture*, 7: 39–41 (in English)]

Иванов А. В., Баряев А. А., Бадрак К. А. (2018) Особенности тренировочного процесса высококвалифицированных следж-хоккеистов в подготовительном периоде. *Адаптивная физическая культура*, 3: 22–24 [Ivanov A. V., Baryayev A. A., Badrak K. A. (2018) Features of the training process for highly qualified sledge hockey players in the preparatory period. *Adaptive Physical Education* [Adaptivnaya fizicheskaya kul'tura], 3: 22–24 (in Russian)]

Колмаков В. И., Картавцева А. И., Составнев И. В. (2024) Международный опыт социальной реабилитации травмированных и раненых участников боевых действий на основе физической активности и адаптивного спорта. *Журнал Сибирского федерального университета. Гуманитарные науки*, 17(2): 374–389 [Kolmakov V. I., Kartavtseva A. I., Sostavnev I. V. (2024) International experience of social rehabilitation of injured and wounded military based on physical activity and adaptive sports. *Journal of Siberian Federal University. Humanities & Social Sciences*, 17(2): 374–389 (in Russian)]

Кононов В. А., Андрейченко В. Е., Белоусов Е. А., Ефремов А. С. (2023) Особенности организации и проведения реабилитации с военнослужащими, пострадавшими в ходе боевых действий, посредством следж-хоккея. *Актуальные проблемы оздоровительной и адаптивной физической культуры и спорта и пути их решения: Сборник научных статей Межвузовской*

научно-практической конференции. Санкт-Петербург, с. 66–69 [Kononov V. A., Andreychenko V. E., Belousov E. A., Efremov A. S. (2023) Features of organizing and carrying out rehabilitation with military service, victims during combat, actions through slage hockey. *Current problems of health-improving and adaptive physical culture and sports and ways to solve them: Collection of scientific articles of the Interuniversity scientific-practical conference*. St. Petersburg, p. 66–69 (in Russian)]

Лазаренко В. Г., Каманцев В. А. (2017) К проблеме определения уровня развития физических качеств в следж-хоккее. *Адаптивная физическая культура*, 2: 27–29 [Lazarenko V. G., Kamantsev V. A. (2017) To the problem of the determination of physical qualities development level in sledge hockey. *Adaptive Physical Education* [Adaptivnaya fizicheskaya kul'tura], 2: 27–29 (in Russian)]

Лазаренко В. Г., Кожевников В. С. (2023) Специальная выносливость и особенности энергообеспечения работы спортсменов в следж-хоккее. *Адаптивная физическая культура*, 1: 42–45 [Lazarenko V. G., Kozhevnikov V. S. (2023) Strength qualities, special endurance and features of energy supply of athletes' work in sledge hockey. *Adaptive Physical Education* [Adaptivnaya fizicheskaya kul'tura], 1: 42–45 (in Russian)]

Нотова С. В., Кияева Е. В., Ермакова Н. В., Казакова Т. В., Маршинская О. В. (2018) Элементный и биохимический профиль спортсменов с ограниченными физическими возможностями. *Экология человека*, 6: 52–58 [Notova S. V., Kiyayeva E. V., Ermakova N. V., Kazakova T. V., Marshinskaya O. V. (2018) The elemental and biochemical profiles of disabled athletes. *Human Ecology* [Ekologiya cheloveka], 6: 52–58 (in Russian)]

Baumgart J. K., Sandbakk O. (2016) Laboratory determinants of repeated-sprint and sport-specific-technique ability in world-class ice sledge hockey players. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 11(2): 182–190

Baumgart J. K., Brurok B., Sandbakk O. (2018) Peak oxygen uptake in Paralympic sitting sports: A systematic literature review, meta- and pooled-data analysis. *PLoS One*, 13(2): e0192903

Berthold J., Dicianno B. E., Cooper R. A. (2013) Pressure mapping to assess seated pressure distributions and the potential risk for skin ulceration in a population of sledge hockey players and control subjects. *Disability and Rehabilitation: Assistive Technology*, 8(5): 387–391

Blauwet C. A., Borgstrom H. E., Tenforde A. S. (2019) Bone health in adaptive sports athletes. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 27(2): 60–66

Busanich R., McAfee E. (2023) Magic carpet ride: A narrative exploration of disability and adaptive physical activity. *Case Studies in Sport and Exercise Psychology*, 7(1): 55–62

Clarsen B., Steffen K., Berge H. M., Bendiksen F., Fossan B., Fredriksen H., Gjelsvik H., Haugvad L., Kjelsberg M., Ronsen O., Torgalsen T., Walløe A., Bahr R. (2021) Methods, challenges and benefits of a health monitoring programme for Norwegian Olympic and Paralympic athletes: the road from London 2012 to Tokyo 2020. *British Journal of Sports Medicine*, 55: 1342–1349

D'Angelo S., Rosa R. (2020) Oxidative stress and sport performance. *Sport Science*, 13(Suppl 1): 18–22

Darrah S. D., Dicianno B. E., Berthold J., McCoy A., Haas M., Cooper R. A. (2016) Measuring static seated pressure distributions and risk for skin pressure ulceration in ice sledge hockey players. *Disability and Rehabilitation: Assistive Technology*, 11(3): 241–246

Declerck L., Kaux J.-F., Vanderthommen M., Lejeune Th., Stoquart G. (2019) The effect of adaptive sports on individuals with acquired neurological disabilities and its role in rehabilitation: A systematic review. *Current Sports Medicine Reports*, 18(12): 458–473

- Dehghansai N., Lemez S., Wattie N., Baker J. (2017) A systematic review of influences on development of athletes with disabilities. *Adapted Physical Activity Quarterly*, 34(1): 72–90
- Derman W., Schweltnus M. P., Jordaan E., Runciman P., Van de Vliet P., Blauwet C., Webborn N., Willick S., Stomphorst J. (2016) High incidence of injury at the Sochi 2014 Winter Paralympic Games: a prospective cohort study of 6564 athlete days. *British Journal of Sports Medicine*, 50(17): 1069–1074
- Diaz R., Miller E. K., Kraus E., Fredericson M. (2019) Impact of adaptive sports participation on quality of life. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 27(2): 73–82
- Di Domenico H., Beaume J. B., Peyrard A., Samozino P., Bowen M., Hintzy F., Millet G. P., Hayes M., Lapole T., Rupp T. (2022) Neuromuscular fatigability during repeated sprints assessed with an innovative cycle ergometer. *European Journal of Applied Physiology*, 122(5): 1189–1204
- Dutton R. A. (2019) Medical and musculoskeletal concerns for the wheelchair athlete: A review of preventative strategies. *Current Sports Medicine Reports*, 18(1): 9–16
- Egan B., Sharples A. P. (2023) Molecular responses to acute exercise and their relevance for adaptations in skeletal muscle to exercise training. *Physiological Reviews*, 103(3): 2057–2170
- Fagher K., Baumgart J. K., Solli G. S., Holmberg H. C., Lexell J., Sandbakk O. (2022) Preparing for snow-sport events at the Paralympic Games in Beijing in 2022: recommendations and remaining questions. *BMJ Open Sport & Exercise Medicine*, 8(1): e001294
- Fairbairn J. R., Huxel Bliven K. C. (2019) Incidence of shoulder injury in elite wheelchair athletes differ between sports: A critically appraised topic. *Journal of Sport Rehabilitation*, 28(3): 294–298
- Flockhart M., Larsen F. J. (2023) Continuous glucose monitoring in endurance athletes: Interpretation and relevance of measurements for improving performance and health. *Sports Medicine* (Online ahead of print)
- Franca E. F., Antunes A., da Silva A. C., Guerra M. L. M., Cossote D. F., Bonfim J. C. O. (2022) Concepts and principles of sports training: A narrative review based on the classic literature of reference. *International Journal of Physical Education, Sports and Health*, 9(1): 214–217
- Furrer R., Hawley J. A., Handschin C. (2023) The molecular athlete: exercise physiology from mechanisms to medals. *Physiological Reviews*, 103(3): 1693–1787
- Gal A. M. (2017) *Biomechanical analysis of the stroking cycle in the sport of sledge hockey*. Thesis: Postdoctoral dissertation. Carleton University, Ottawa, Ontario, 241 p.
- Goldman P., Pandit B., Gomez D., Lu S., Mills C., Kull N., Ku R., Aramie A., Kim A., Alexandru A., Hu J., Neufeld E. V., Dolezal B. (2022) Effect of real-time feedback on power output using a novel smart-resisted sled push. *International Journal of Exercise Science*, 15(6): 1578–1586
- Hawkeswood J., Finlayson H., O'Connor R., Anton H. (2011) A pilot survey on injury and safety concerns in international sledge hockey. *International Journal of Sports Physical Therapy*, 6(3): 173–185
- Hawley J. A., Lundby C., Cotter J. D., Burke L. M. (2018) Maximizing cellular adaptation to endurance exercise in skeletal muscle. *Cell Metabolism*, 27(5): 962–976
- Hendrickse P. W., Venckunas T., Platkevicius J., Kairaitis R., Kamandulis S., Snieckus A., Stasiulis A., Vitkiene J., Subocius A., Degens H. (2021) Endurance training – induced increase in muscle oxidative capacity without loss of muscle mass in younger and older resistance – trained men. *European Journal of Applied Physiology*, 121(11): 3161–3172
- Heyward O. W., Vegter R. J. K., de Groot S., van der Woude L. H. V. (2017) Shoulder complaints in wheelchair athletes: a systematic review. *PLoS One*, 12(11): e0188410

- Jung E.-J., Jang L.-G., Choi G.-H., Park H. (2017) Core and body surface temperature changes during sledge hockey competition. *Korean Journal of Sports Science*, 26(2): 1037–1044
- Leuchtmann A. B., Mueller S. M., Aguayo D., Petersen J. A., Ligon-Auer M., Fluck M., Jung H. H., Toigo M. (2020) Resistance training preserves high-intensity interval training induced improvements in skeletal muscle capillarization of healthy old men: a randomized controlled trial. *Scientific Reports*, 10: 6578
- Liang Y. (2020) *Analysis and algorithms for parametrization, optimization and customization of sled hockey equipment and other dynamical systems. Thesis: Ph. D.* Massachusetts Institute of Technology, Department of Mechanical Engineering, 168 p.
- Luijten S., te Loo L., Nauta J., Janssen T., Holla J., Otten R., Vriend I., Verhagen E. (2021) Sports injuries in adapted sports: a systematic review with quality assessment. *British Journal of Sports Medicine*, 55(Suppl 1): A171
- Lund Ohlsson M., Laaksonen M. S. (2017) Sitting position affects performance in cross-country sit-skiing. *European Journal of Applied Physiology*, 117(6): 1095–1106
- Martin Ginis K. A., van der Ploeg H. P., Fosrer C., Lai B., McBride C. B., Ng K., Pratt M., Shirazipour C. H., Smith B., Vasquez P. M., Heath G. W. (2021) Participation of people living with disabilities in physical activity: a global perspective. *Lancet*, 398(10298): 443–455
- Mason B., Warner M., Briley S., Goosey-Tolfrey V., Vegter R. (2020) Managing shoulder pain in manual wheelchair users: a scoping review of conservative treatment interventions. *Clinical Rehabilitation*, 34(6): 741–753
- McKinnon A., Bassett-Gunter R. L., Fraser-Thomas J., Arbour-Nicitopoulos K. P. (2022) Understanding sport as a vehicle to promote positive development among youth with physical disabilities. *Journal of Sport for Development*, 10(2): 55–71
- Morrien F., Taylor M. J. D., Hettinga F. J. (2017) Biomechanics in Paralympics: implications for performance. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 12(5): 578–589
- Napolitano J., Iliescu D., Hoehn J., Berner T., Meyer C., Jackson K., Kemp E. (2021) Athlete identity and common benefits and barriers to sport participation amongst adolescent sled hockey players. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 9(7\_suppl 3)
- Naveed S. (2023) *Dynamical systems analysis and algorithms for optimizing sled hockey equipment and other applications. Thesis: Postdoctoral dissertation.* University of California, California, 20 p.
- Oh H., Johnson W., Syrop I. P. (2019) Winter adaptive sports participation, injuries, and equipment. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 27(2): 56–59
- O’Leary T. J., Collett J., Howells K., Morris M. G. (2017) Endurance capacity and neuromuscular fatigue following high- vs moderate-intensity endurance training: A randomized trial. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 27(12): 1648–1661
- Park S., Um S., Park J. (2016) Jersey design and pattern making for disable players of ice sledge hockey. *Journal of Fashion Business*, 20(3): 43–53
- Pellegrini B., Hettinga F. J., Mourot L. D., Vernillo G., Schena F. (2023) State of the art perspectives of sports science in the run-up to the Milano Cortina 2026 Olympic Winter Games. *Sport Sciences for Health*, 19(4): 1039–1042
- Raichlen D. A., Alexander G. E. (2017) Adaptive capacity: an evolutionary neuroscience model linking exercise, cognition, and brain health. *Trends in Neurosciences*, 40(7): 408–421

- Ralph K., Morris E. A., Kwon J. (2022) Disability, access to out-of-home activities, and subjective well-being. *Transportation Research Part A: Policy and Practice*, 163: 209–227
- Ripat J., Sibley K. M., Giesbrecht E., Curtis B., Touchette A., Borisoff J., Ethans K., Li Y., Morales E. (2020) Winter mobility and community participation among people who use mobility devices: A scoping review. *Archives of Rehabilitation Research and Clinical Translation*, 2(1): 100018
- Rosso V., Cinus G., Gastaldi L. (2020) Laboratory and on ice tests to evaluate kinematics of Para ice hockey players. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part P: Journal of Sports Engineering and Technology*, 234(2): 176–187
- Sandbakk O., Hansen M., Ettema G., Ronnestad B. (2014a) The effects of heavy upper-body strength training on ice sledge hockey sprint abilities in world class players. *Human Movement Science*, 38: 251–261
- Sandbakk O., Spencer M., Ettema G., Sandbakk S. B., Skovereng K., Welde B. (2014b) The physiology and biomechanics of upper-body repeated sprints in ice sledge hockey. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 9(1): 77–84
- Sandbakk O., Skalvik T. F., Spencer M., van Beekvelt M., Welde B., Hegge A. M., Gjovaag T., Ettema G. (2015) The physiological responses to repeated upper-body sprint exercise in highly trained athletes. *European Journal of Applied Physiology*, 115(6): 1381–1391
- Sawczuk D., Gac P., Poreba R., Poreba M. (2023) The prevalence of cardiovascular diseases in paralympic athletes. *Healthcare*, 11(7): 1027
- Skovereng K., Ettema G., Welde B., Sandbakk O. (2013) On the relationship between upper-body strength, power, and sprint performance in ice sledge hockey. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 27(12): 3461–3466
- Smith B., Kirby N., Skinner B., Wightman L., Lucas R., Foster C. (2019) Infographic. Physical activity for disabled adults. *British Journal of Sports Medicine*, 53(6): 335–336
- Sobry A. J., Kolstad A. T., Janzen L., Black A. M., Emery C. A. (2021) Injury rates, types and mechanisms in sledge hockey: implications for grassroots through elite participation. *British Journal of Sports Medicine*, 55(Suppl 1): A171–A172
- Sobry A. J., Kolstad A. T., Janzen L., Black A. M., Emery C. A. (2022) Concussions and injuries in sledge hockey: Grassroots to elite participation. *Clinical Journal of Sport Medicine*, 32(5): e478–e484
- Song Y.-G., Won Y. H., Park S.-H., Ko M.-H., Seo J.-H. (2015) Changes in body temperature in incomplete spinal cord injury by digital infrared thermographic imaging. *Annals of Rehabilitation Medicine*, 39(5): 696–704
- Song Y., Zhang W., Zhao L., Sun D., Huang Y., Gu Y. (2020) Sports-related injuries sustained by disabled athletes in Winter Paralympic Games: A systematic review. *Journal of Medical Imaging and Health Informatics*, 10(5): 1136–1143
- Soo Hoo J. A., Lutzka E., Harrast M. A. (2019) A descriptive study of self-reported injury in non-elite adaptive athletes. *PM&R*, 11(1): 25–32
- Spangenberg J., Nussbaum R., Chen L., Jayabalan P. (2021) Risk factors for the development of shoulder pain in elite sled hockey players. *PM&R*, 13(12): 1392–1398
- Spriet L. L. (2022) Anaerobic metabolism during exercise. *Exercise Metabolism. Physiology in Health and Disease*. McConell G. (ed.) Springer, Cham, p. 51–70
- Steffen K., Clarsen B., Cjelsvik H., Haugvad L., Koivisto-Mork A., Bahr R., Berge H. M. (2022) Illness and injury among Norwegian Para athletes over five consecutive Paralympic Summer and Winter

Games cycles: prevailing high illness burden on the road from 2012 to 2020. *British Journal of Sports Medicine*, 56(4): 204–212

Tornero-Aguilera J. F., Jimenez-Morcillo J., Rubio-Zarapuz A., Clemente-Suarez V. J. (2022) Central and peripheral fatigue in physical exercise explained: A narrative review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(7): 3909

Varahra A., Ahmed H., Lindsay S. (2022) Exploring direct and indirect associations of exercise and sport participation with employment among individuals with disabilities: A scoping review. *Journal of Occupational Rehabilitation*, 32(1): 44–54

Weavil J. C., Amann M. (2019) Neuromuscular fatigue during whole body exercise. *Current Opinion in Physiology*, 10: 128–136

Webborn N., Willick S., Emery C. A. (2012) The injury experience at the 2010 Winter Paralympic Games. *Clinical Journal of Sport Medicine*, 22(1): 3–9

Worden-Rogers C. (2012) *Effect of sledge hockey configuration on sledge hockey performance*. Electronic Thesis and Dissertation Repository, 86 p.

Wu F., Liu Y., Zhuang M. (2022) Lessons from the Winter Paralympic Games disclosing the epidemiology of winter sports injury in paralytic athletes: a meta-analysis. *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation*, 14: 53

Zapf A. D., Joyce J. P. (2018) Ice sled hockey (sledge hockey outside the United States). *Adaptive sports medicine*. De Luigi A. (ed.) Springer, Cham, p. 245–249

EDN: SNCUKC

УДК 57.083.1.001.365:616–36.5–022.532

## **Biocompatible Systems for Controlled Delivery of Antiseptics for Topical Application**

**Alexandra V. Vladimirova<sup>\*a</sup>, Anastasiya V. Murueva<sup>b</sup>,  
Anna M. Shershneva<sup>a</sup>, Svetlana V. Prudnikova<sup>a</sup>,  
Alexander V. Shabanov<sup>c</sup> and Ekaterina I. Shishatskaya<sup>a, b</sup>**

*<sup>a</sup>Siberian Federal University*

*<sup>b</sup>Institute of Biophysics SB RAS*

*Federal Research Center*

*“Krasnoyarsk Science Center SB RAS”*

*<sup>c</sup>L.V. Kirensky Institute of Physics SB RAS*

*Federal Research Center*

*“Krasnoyarsk Science Center SB RAS”*

*Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 20.10.2022, received in revised form 30.01.2023, accepted 11.03.2024

**Abstract.** Controlled drug delivery is one of the frontier areas of science, which uses an interdisciplinary approach. The delivery systems offer numerous advantages over conventional dosage forms, such as improved efficacy and patient compatibility, reduced toxicity, and ease of use. Such systems often use micro- and nanoparticles as carriers for drugs, the prolonged effect of which is achieved due to the controlled slow release of the encapsulated drug. This study investigated the effects of encapsulation of various antiseptics (brilliant green, miramistin, and furacilin) and the chemical composition of the polymer on the yield, structure, size, drug release kinetics, and antibacterial activity of microparticles produced from resorbable polyesters of microbiological origin, polyhydroxyalkanoates. Microparticles with a 5.6–94.8  $\mu\text{m}$  diameter were produced. The form of the active substance molecule has been found to be the most significant factor affecting the characteristics of polyhydroxyalkanoate microparticles. The surface structure of particles is rather determined by the chemical composition of the polymer, and the release kinetics to the model medium depends on the encapsulated drug. Microparticles based on PHAs loaded with brilliant green and furacilin showed antibacterial effects in *S. aureus* and *E. coli* cultures. The study demonstrated that microparticles with antiseptics encapsulated in them have potential as prolonged drug delivery systems and are of interest for further research.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: avladimirova@sfu-kras.ru

ORCID: 0009-0007-0989-9285 (Vladimirova A.); 0000-0001-8990-3043 (Prudnikova S.); 0000-0002-2389-4698 (Shabanov A.); 0000-0001-7967-243X (Shishatskaya E.)

**Keywords:** polyhydroxyalkanoates, drug delivery system, controlled delivery, wound healing, reconstructive technologies, topical antiseptics.

**Acknowledgments.** The authors thank the Siberian Federal University and Krasnoyarsk Regional Center of Research Equipment of Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center SB RAS» for providing the equipment.

Citation: Vladimirova A. V., Murueva A. V., Shershneva A. M., Prudnikova S. V., Shabanov A. V., Shishatskaya E. I. Biocompatible systems for controlled delivery of antiseptics for topical application. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(1), 19–32. EDN: SNCUKC



## **Биосовместимые системы для контролируемой доставки антисептиков для местного применения**

**А. В. Владимирова<sup>а</sup>, А. В. Муруева<sup>б</sup>, А. М. Шершнева<sup>а</sup>,  
С. В. Прудникова<sup>а</sup>, А. В. Шабанов<sup>б</sup>, Е. И. Шишацкая<sup>а, б</sup>**

*<sup>а</sup>Сибирский федеральный университет*

*<sup>б</sup>Институт биофизики СО РАН*

*ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»*

*<sup>а</sup>Институт физики им. Л. В. Киренского СО РАН*

*ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»*

*Российская Федерация, Красноярск*

**Аннотация.** Технология контролируемой доставки лекарств является одной из передовых областей науки, включающей междисциплинарный научный подход. Эти системы доставки обладают многочисленными преимуществами по сравнению с обычными лекарственными формами, такими как повышенная эффективность и биосовместимость, сниженная токсичность и простота использования. В таких системах в качестве носителей лекарственных средств часто используют микро- и наночастицы, пролонгированное действие которых достигается за счет контролируемого медленного высвобождения инкапсулированного лекарственного средства. В данном исследовании изучалось влияние включения различных антисептиков (бриллиантовый зелёный, мирамистин и фурацилин), а также химического состава полимера на выход, структуру, размер, кинетику высвобождения лекарственных средств и антибактериальную активность микрочастиц, полученных из резорбируемых полиэфиров микробиологического происхождения, полигидроксиалканоатов. Было получено семейство микрочастиц диаметром 5,6–94,8 мкм. Установлено, что наиболее значимым фактором, влияющим на характеристики микрочастиц полигидроксиалканоатов, является форма молекулы активного вещества. Структура поверхности частиц больше зависит от химического состава полимера, а кинетики выхода в модельную среду – от инкапсулированного лекарства. Микрочастицы на основе ПГА с депонированными бриллиантовым зелёным и фурацилином показали антибактериальное действие в культурах

*S. aureus* и *E. coli*. Результаты продемонстрировали, что микрочастицы с депонированными антисептиками обладают потенциалом в качестве систем пролонгированной доставки и представляют интерес для дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** полигидроксиканоаты, системы доставки лекарств, контролируемая доставка, заживление ран, реконструктивные технологии, антисептики местного действия.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Сибирскому федеральному университету и Красноярскому региональному центру коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН за предоставление оборудования.

---

Цитирование: Владимирова А. В. Биосовместимые системы для контролируемой доставки антисептиков для местного применения / А. В. Владимирова, А. В. Муруева, А. М. Шершнева, С. В. Прудникова, А. В. Шабанов, Е. И. Шишацкая // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(1). С. 19–32. EDN: SNCUKC

---

## Introduction

Over the past few decades, a considerable amount of research has been devoted to the development of nano- and micro-carriers using biocompatible and biodegradable materials for medical and biotechnological applications. Polymer microparticle systems have become an integral part of controlled and prolonged drug delivery, because they can be easily adapted to various administration methods (oral, topical, inhalation, etc.) (Campos et al., 2013; Anselmo, Mitragotri, 2014; Eke et al., 2014). In addition, such systems can transport several drugs simultaneously (González et al., 2020). The absence of infection is a prerequisite for successful complete tissue regeneration. With normal healing, the wound cleansing process lasts several days, but the development of an infection significantly increases this time. The combination of components with antibiotic, regenerative or anti-inflammatory properties and polymeric materials is a promising approach to meet all the requirements of next-generation bioactive healing systems (Zhang et al., 2013; Teo et al., 2017). A fast and effective wound healing process will significantly reduce the cost of medical care, wound care, and hospitalization,

which will significantly improve patients' health-related quality of life (Zhang et al., 2018).

The materials used for encapsulation directly affect the particle properties, encapsulation efficiency, and the behaviour of microparticles in the body (Khem et al., 2016). In this context, the polymeric material and microencapsulation process are crucial factors that determine the efficiency and stability of such systems.

Bacterial polyester polyhydroxyalkanoates (PHAs) are currently among the major biodegradable polymers to develop controlled and prolonged drug delivery systems (Bonartsev et al., 2012; Liu et al., 2014; Lizarraga-Valderrama et al., 2016; Murueva et al., 2019). They are polyesters of (R)-3-hydroxy-alkane acids, which are accumulated intracellularly by various microorganisms as sources of carbon and energy. PHAs are particularly attractive for use in drug delivery because of their properties, such as optical activity, biocompatibility, nontoxicity, thermoplastic and biodegradable properties. The *in vivo* biodegradation of PHAs occurs via humoral and cellular pathways, involving macrophages and giant cells of foreign bodies, with the high activity of acid phosphatase, which correlates with the activity of the enzyme in the

blood serum of animals. The process of *in vivo* biodegradation of PHAs depends on the chemical structure of the polymer, the shape and place of implantation of the product. A decrease in the mass of polymer products implanted subcutaneously into muscle tissue and bone is accompanied by minor changes in the microstructure of the implants, without significant loss of strength, for a long time. PHAs, affected by macrophage cells, which are highly active in acid phosphatase, slowly degrade *in vivo* without a sharp loss of strength, ensuring long-term functioning of polymer products – from several months to a year or more. Polyhydroxyalkanoates have been extensively studied for use in tissue engineering and the development of medical devices (Lim et al., 2017; Koller, 2018). Particular attention should be paid to the biocompatibility of these polymers in terms of their potential in controlled release formulations (Imre, Pukánszky, 2013; Zhang et al., 2018).

By using modern encapsulation techniques, various substances can be entrapped in particles. Nevertheless, a review of the literature revealed a considerably smaller amount of data on encapsulation of pigments with bacteriostatic effect compared to the data regarding other bioactive substances/antiseptics. Chlorhexidine is one of the most common and best-studied antiseptic drug products encapsulated in polymer microparticles. Despite its effectiveness, it can cause allergic reactions ranging from skin symptoms to anaphylactic shock (Silvestri, McEnery-Stonelake, 2013; Toholka, Nixon, 2013).

Furacilin is another widely used antiseptic for encapsulation in polymer matrices. S. Yu. Zaitsev and others studied films with furacilin. Using a mixture of N-polyvinylpyrrolidone and polyvinyl alcohol and a mixture of copolymer of N-vinylpyrrolidone with maleic anhydride, the researchers produced transparent films with furacilin embedded into them. Repeatedly

swollen gel films were tested as dressings for the treatment of burns and wounds. The (co) polymer films had antimicrobial properties and were able to absorb wound exudate. The film was easily separated from the wound surface. Such preparations can be used in human and veterinary medicine as burn dressings and other medical materials (Zaitsev et al., 2015). Also, in order to create biodegradable polymeric materials for the delivery of medicinal substances, A. A. Ol'khov and his colleagues studied the PHB-shungite–furacilin triple system, which turned out to be very promising: with an increase in the shungite content from 0 to 5 %, the rates of drug release from the composites decreased by a factor of 10. The supposed formation of PHB-furacilin–shungite associates leads to a significant increase in the strength of composite films (by a factor of 2–3) as compared with the initial and two-component films (Ol'khov et al., 2012).

The antimicrobial activity of miramistin was also studied. The article by Kamaeva S. S. described the development of medicinal films based on acrylamide, vinyl, and acrylic monomers with miramistin for the treatment of inflammatory diseases in gynaecology. The developed films showed a pronounced antimicrobial effect against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Treponema pallidum*, pathogenic fungi, some viruses, and protozoa (Kamaeva, Potselueva, 2010). Yu. G. Chernetskaya showed high antifungal activity of hydrogel polymer matrices containing miramistin against *Candida albicans*. A clinical study demonstrated that the applications of the miramistin hydrogel sheets 0.05 % produce a local bacteriostatic effect, which is confirmed by a pronounced decrease in the microbial number, and protect wounds from secondary infection (Chernetskaya et al., 2009).

The topical antiseptics effectively control the bacterial load, but they can also cause local cytotoxicity and wound drying and reduce

healing rate. Choosing the most effective and safe antiseptic is crucial to prevention of infection when treating various skin injuries. When a system with an antiseptic based on PHA microparticles is applied to damaged skin, the plastic fills the tissue defect and delivers the drug to the injured area.

The objective of this study was to create carriers for the controlled delivery of bioactive substances in the form of microparticles based on polyhydroxyalkanoates (PHAs), study their functional characteristics, and assess their *in vitro* efficiency for potential use in skin surgery.

### Materials and methods

Two types of polyhydroxyalkanoates, which are biodegradable and biocompatible polymers, were used: poly(3-hydroxybutyrate)(P(3HB)) with a molecular weight of 1200 kDa and a copolymer of 3-hydroxybutyrate with 3-hydroxyvalerate (P(3HB)-co-P(3HV)), 1500 kDa, containing 11 % 3HV. Topical antiseptics, such as brilliant green, miramistin, and furacilin were chosen as model drugs for encapsulation (Table 1).

Microparticles were produced using an emulsion method based on evaporation of a solvent from a double emulsion. This method has recently been of great interest because of its ability to encapsulate and release hydrophilic or solid substances as drug delivery systems in cosmetics and food products (Iqbal et al., 2015). We added an aqueous solution of the drug with a content equal to 10 % of the polymer weight to a 2 % polymer solution dissolved in dichloromethane. The solutions were homogenized using Sonicator-S 3000 ultrasound bath made by Misonix Incor. (USA) at a power of 7W for 2 min. Then, we poured the resulting emulsion stepwise into 100 ml of a 1 % aqueous solution of polyvinyl alcohol stirred with a magnetic stirrer at 750 rpm. We left the resulting double emulsion for 24 h under constant mechanical stirring until

the solvent completely evaporated. We then collected the microparticles by centrifugation (9,000 rpm for 5 min), washed them with distilled water and dried in a drying oven at 37 °C.

The microparticle yield was calculated as a percentage of the weight of the polymer used to produce these microparticles. Microparticle morphology was studied by scanning electron microscopy using TM4000 microscopes (Hitachi, Japan). Platinum sputtering of samples was performed in a K575XD Turbo unit (Emitech, UK).

The size and distribution of polymer microparticles were studied using the Eclipse Ti-U light microscope (Nikon, Japan) by analysing 10 fields of view.

The electrokinetic potential (zeta potential), which is determined by the electrophoretic mobility of the particles in the suspension, was measured using Henry's equation on a Zetasizer Nano ZS particle analyser. Measurements were performed automatically according to the standard procedure recommended by the manufacturer.

The drug amount to be included in the polymer matrix was determined by spectrophotometry based on its initial and residual emulsion concentration at 625 nm (brilliant green), 260 nm (miramistin), and 367 nm (furacilin), using a Cary 60 UV-Vis spectrophotometer (Agilent Technologies, USA).

To study the kinetics of the drug release from the polymer matrix, microparticles produced from PHAs and loaded with drugs were sterilised by UV radiation for 3 hours and placed in sterile test tubes with caps containing 40 ml of a phosphate-buffer saline (pH 7.4) each. The tubes were incubated in a thermostat at 37 °C (n = 3). The samples were taken in 1; 2; 3; 6; 8; 24; 48; 72; 168; 240; 528; and 648 hours. Microparticles were precipitated by centrifugation (9,000 rpm for 5 min), and the amount of drug released into the medium was determined by analysing

Table 1. Drugs used for encapsulation in polymer matrices

Drug	Manufacturer	Formula	Molecular weight, g/mol	Mechanism of action
Brilliant green Bis-(p-diethylamino) triphenylmethanehydrocarbinol oxalate	Obnovlenic PFK, Russia		475.6	Scarcely studied
Miramistin Benzyltrimethyl[3-( myristoylamino)propyl] ammonium chloride	LLC INFAMED K, Russia		457.2	It interacts with a lipid layer of microorganism membranes, causing their destruction and increasing permeability, induces cytolysis.
Furacilin Semicarbazone 5-nitrofurfural [(E)- [(5-nitrofuran-2-yl) methylidene]amino] urea	Irbit Chemical and Pharmaceutical Plant JSC, Russia		198.2	It restores 5-nitro groups of microbial flavoproteins with the formation of reactive amino derivatives that cause changes in proteins, causing the death of the cells of pathological microorganisms.

the supernatant liquid using a Cary 60 UV–Vis spectrophotometer (Agilent Technologies, USA). The encapsulation efficiency of the drug in the polymer matrix and drug release in a phosphate buffer were calculated using generally accepted formulas (Murueva et al., 2013).

The antibacterial activity of microparticles loaded with antiseptics was determined using the disk diffusion method and the minimum inhibitory concentration method against Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. The disk diffusion method is based on recording the diameter of the zone of growth inhibition of the studied microorganisms around the carrier of an antibacterial drug (paper disk).

To obtain a nutrient medium, Mueller-Hinton medium (BioRad, France) was diluted with distilled water (at the rate of 25 ml per cup) and heated until complete dissolution. Then, the prepared Petri dishes and nutrient medium were sterilised by autoclaving at 1 A and 121 °C for 3 hours. After cooling, the Petri dishes were filled with the molten medium so that the thickness of the agar layer in the dish was 4 mm on average and left at room temperature until completely solidified.

To determine the sensitivity of microorganisms to antiseptic preparations, we used an inoculum corresponding to a density of 0.5 according to the McFarland standard and containing about  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml. Inoculation was carried out with sterile cotton swabs with uniform stroke movements, turning the Petri dish at an angle of 30°. After 10 minutes, vertical wells 1 cm in diameter were made in the middle of the Petri dish in agar, and a suspension of microparticles in physiological saline and antiseptic solutions (300 µl) were transferred into them. Then the Petri dishes were left in a thermostat at 37 °C. Twenty-four hours later, the diameter of the culture inhibition zones was measured.

## Results and discussion

Techniques based on double emulsions are commonly used for the encapsulation of both hydrophobic and hydrophilic drugs, cosmetics, foods, and other high value products (Iqbal et al., 2015).

The functional characteristics of microparticles based on P(3HB) and P(3HB)-co-P(3HV) produced by an emulsion method and loaded with various antiseptics for topical use that were studied here included size, yield, suspension stability, and drug release kinetics.

All microparticles produced from PHAs were spherical in shape. Small defects were observed on the surface of the particles (Fig. 1), indicating possible adhesion and aggregation of microparticles during the production process. There were no obvious differences associated with the different chemical composition of the particles. However, P(3HB)-based particles had a more regular spherical shape but were heterogeneous in size. The microphotographs showed the presence of large particles, but they only accounted for 1 % of the total number of microparticles. The irregular shape of large particles can be attributed to the formation of sufficiently large polymer droplets created by merging of microparticles during the production process.

Particles from P(3HB) with furacilin had the most deformed shape and the largest size. Microparticles loaded with brilliant green were homogeneous in shape and size.

The main characteristics of the empty microparticles, as well as those loaded with antiseptics are shown in Table 2. Initial loading with biologically active substances was performed at the polymer to antiseptic ratio of 9:1.

The average diameter of the microparticles with encapsulated antiseptics was about 50.5 µm, which was close to the average diameter of the non-loaded particles (67 µm). These results show

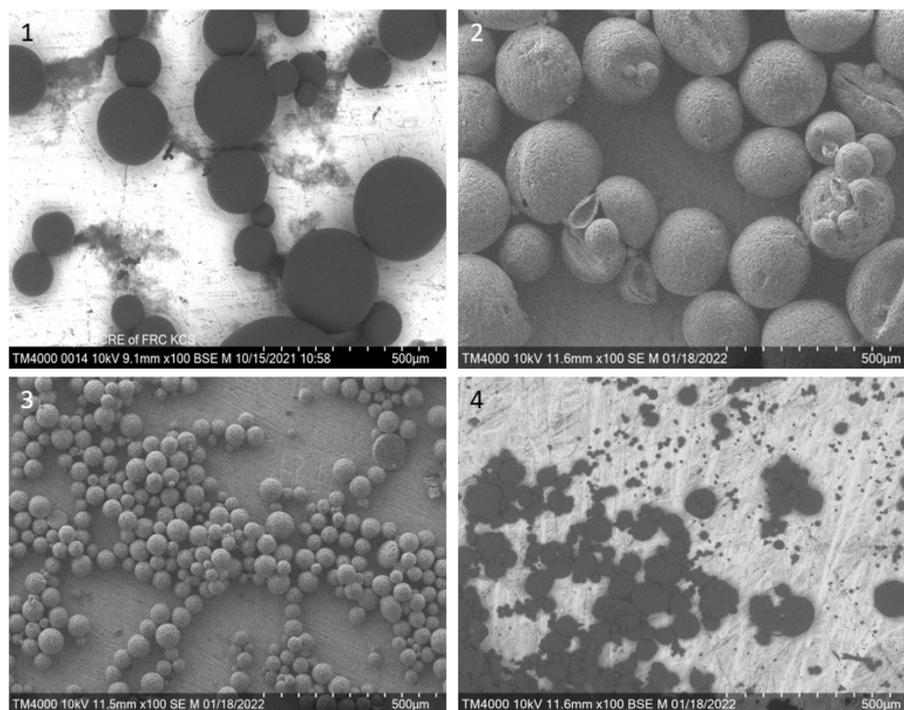


Fig. 1. SEM micrographs of microparticles from P(3HB) (1), P(3HB) with furacilin (2), P(3HB) with brilliant green (3), P(3HB) with miramistin (4). Marker 500  $\mu\text{m}$

Table 2. Characteristics of microparticles loaded with antiseptics

Microparticle composition	Average diameter, $\mu\text{m}$	Zeta potential, mV	Encapsulation efficiency, %	Yield, %
P(3HB) + brilliant green	$61.25 \pm 0.66$	$-27.30 \pm 1.90$	95.5	80.0
P(3HB) + miramistin	$5.64 \pm 0.17$	$-0.805 \pm 0.40$	82.4	82.5
P(3HB) + furacilin	$94.81 \pm 2.40$	$-29.10 \pm 1.76$	80.0	67.5
P(3HB)-co-P(3HV) + brilliant green	$58.86 \pm 1.34$	$-22.40 \pm 0.66$	98.8	81.5
P(3HB)-co-P(3HV) + miramistin	$37.14 \pm 3.59$	$-6.60 \pm 1.20$	92.0	76.5
P(3HB)-co-P(3HV) + furacilin	$45.73 \pm 0.08$	$-29.90 \pm 4.01$	96.7	93.5
P(3HB)	$63.56 \pm 1.67$	$-19.20 \pm 0.95$	-	92.0
P(3HB)-co-P(3HV)	$70.80 \pm 1.73$	$-27.50 \pm 0.95$	-	94.0

that loading with antiseptics does not significantly change the average diameter of the microparticles. Besides, no relationship was found between the chemical composition of the polymer and the average diameter of the microparticles.

In a study by E. V. Grekhneva et al., the authors microencapsulated furacilin into water-

soluble polymers of natural (sodium alginate and guar gum) and synthetic (polyvinyl alcohol and polyvinylpyrrolidone) origin. Furacilin microcapsules made of synthetic polymers formed 4 to 10  $\mu\text{m}$  agglomerates, which indicated that the system was not monodisperse (Grekhneva et al., 2017).

The study of the electrokinetic potential of the polymer drug delivery systems showed that microparticles made of P(3HB) and copolymer P(3HB-co-3HB) with encapsulated miramistin had the lowest values of  $\zeta$ -potential, indicating a tendency of particles to rapid agglomeration.

In another work, cross-linked chitosan microspheres with different contents of miramistin were produced by spray drying. The particle size ranged from  $2.4 \pm 0.6$  to  $3.1 \pm 1.0$   $\mu\text{m}$ . Drug incorporation and encapsulation efficiency were about 30.8 % and 92.0 %, respectively. The release profile of miramistin *in vitro* showed that 80 % (wt.) of the encapsulated miramistin was released from chitosan microspheres after 2–4 hours (Grib, 2014).

Microparticles of calcium pectinate were also prepared by spray drying. Kulikouskaya V.I. developed a technique enabling encapsulation of up to 30 wt.% miramistin. In normal saline, the yield of the substance was 2/3 of the encapsulated amount after 48 h (Kulikouskaya et al., 2015).

The microparticles made of P(3HB) and P(3HB)-co-P(3HV) with furacilin had the highest value of  $\zeta$ -potential, which confirmed their stability. Encapsulation of antiseptics increases the electrokinetic potential and, hence, enhances the stability of microparticles. A possible relationship between the average diameter and

zeta potential was not revealed. Moreover, there was no relationship between  $\zeta$ -potential and the chemical composition of the polymer.

In addition to the size and stability of the produced systems, an important criterion for practical application is the outflow of the drug product from the microspheres. The antiseptic was released into the model medium at a high rate, increasing stepwise in a month. On the first day of observation, the average release of the drug was 16 % (P(3HB) with brilliant green) and 11 % (P(3HB) with furacilin). After that, the drug concentration in the medium increased by an average of 2.5 % per day (Fig. 2). The maximum release of antiseptics was 34.6 % from particles loaded with brilliant green and 25.7 % from particles loaded with furacilin. No burst release was observed, indicating the high quality of the delivery system produced. The study by Kosenko et al. addressed the mechanisms for the release of furacilin from PHB membranes. The authors found that the release occurs simultaneously by diffusion and kinetic mechanisms by zero-order reactions, and the diffusion coefficients depend on the concentration of the drug (Kosenko et al., 2007). The study by Ol'khov et al. demonstrated the possibility of using polyamide-PHB mixtures as matrices for the long-term release of furacilin

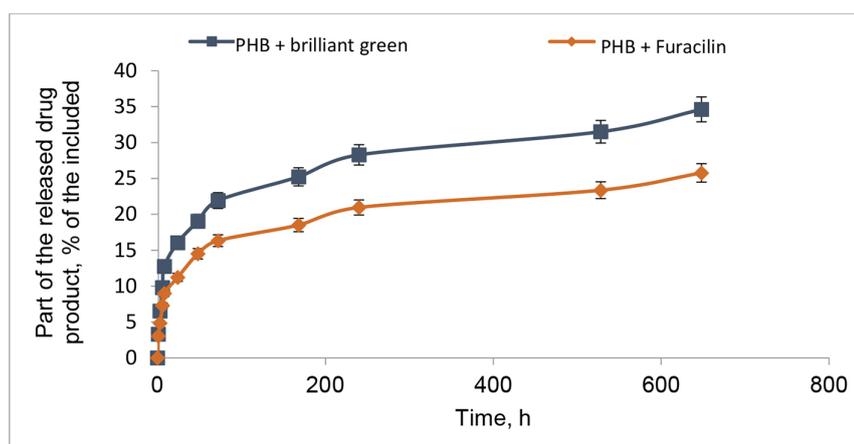


Fig. 2. Curves of antiseptic release from P(3HB)-microparticles

with a constant release rate for more than 1 month. The results obtained show the suitability of embedding furacilin in polymeric matrices for sustained release (Ol'khov et al., 2018).

Verification of the antibacterial activity of the engineered particles was carried out in cultures of *S. aureus* and *E. coli*, which represent the most common Gram-positive and Gram-negative bacteria in the human body. The results of the antibacterial evaluation are shown in Table 3 and Fig. 3–5.

The study of the effectiveness of the PHA-brilliant green system against *S. aureus* and *E. coli* grown on agar demonstrated a low antibacterial effect compared to the control – the initial form of the antiseptic, a 1 % alcohol solution of the drug. The smaller zones of growth inhibition in *E. coli* culture compared to *S. aureus* culture are associated with the lower effectiveness of brilliant green against Gram-negative microorganisms.

Particles loaded with furacilin produced a low antibacterial effect as well. That could be caused by the slow release of the antiseptic from the polymer matrix: about 2 mg on Day 1. Grehneva et al. studied the antimicrobial activity of furacilin encapsulated in matrices of polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone,

sodium alginate, and guar gum. The authors noted that the antimicrobial activity of the antiseptic in PVA and PVP matrices was slightly lower than the activity of the initial solution against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and others. One exception was *Candida albicans*, whose inhibition by the encapsulated drug was greater by a factor of two (Grehneva et al., 2017).

In addition to the experiments described above, the activity of P(3HB) and P(3HB)-co-P(3HV) microparticles non-loaded with antiseptics (Fig. 5) and saline used to prepare the suspension of microparticles was also tested as the control. In both cases, no growth inhibition of the bacterial growth was observed, which showed that neither the chemical composition of the polymer nor the medium used to prepare the suspension affected the effectiveness of the encapsulated formulations of brilliant green and furacilin.

## Conclusions

The current study showed that loading of the antiseptics into PHA microparticles resulted in adequate values of encapsulation efficiency, drug release, and stability in the model medium. Brilliant green and furacilin demonstrated high

Table 3. Diameters of growth inhibition zones of *S. aureus* and *E. coli* cultures

Sample	Inhibition zone diameter, mm	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Saline	-	-
P(3HB) MP	-	-
P(3HB)-co-P(3HV) MP	-	-
Brilliant green	6.50	5.50
P(3HB) with brilliant green MP	3.25	2.50
P(3HB)-co-P(3HV) with brilliant green MP	3.50	2.50
Furacilin	7.00	6.50
P(3HB) with furacilin MP	2.50	2.00
P(3HB)-co-P(3HV) with furacilin MP	2.55	2.25

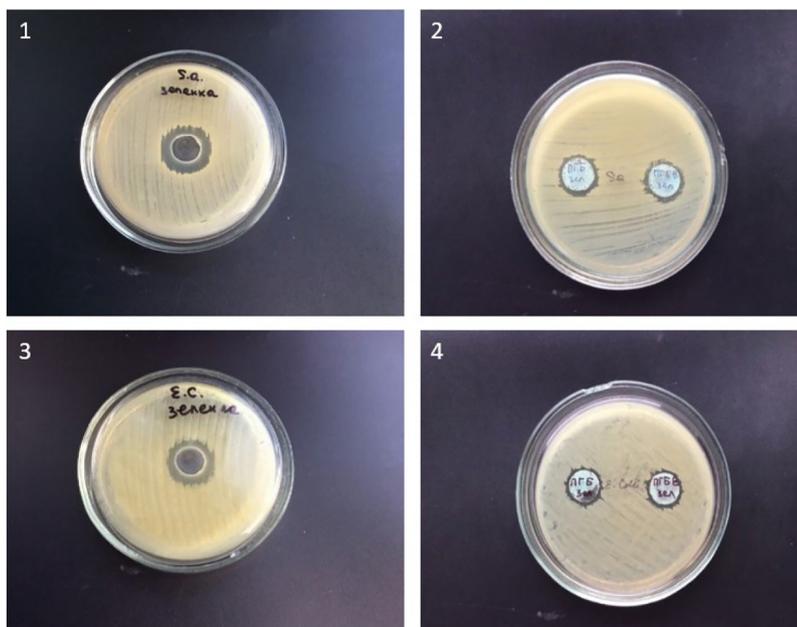


Fig. 3. Zones of growth inhibition of *Staphylococcus aureus* (1, 2) and *Escherichia coli* (3, 4) after the introduction of brilliant green and P(3HB) and P(3HB)-co-P(3HV) microparticles with encapsulated brilliant green: 1 – Effect of brilliant green on *Staphylococcus aureus*, 2 – P(3HB) and P(3HB)-co-P(3HV) microparticles with encapsulated brilliant green, 3 – Effect of brilliant green on *Escherichia coli*, 4 – P(3HB) and P(3HB)-co-P(3HV) microparticles with encapsulated brilliant green

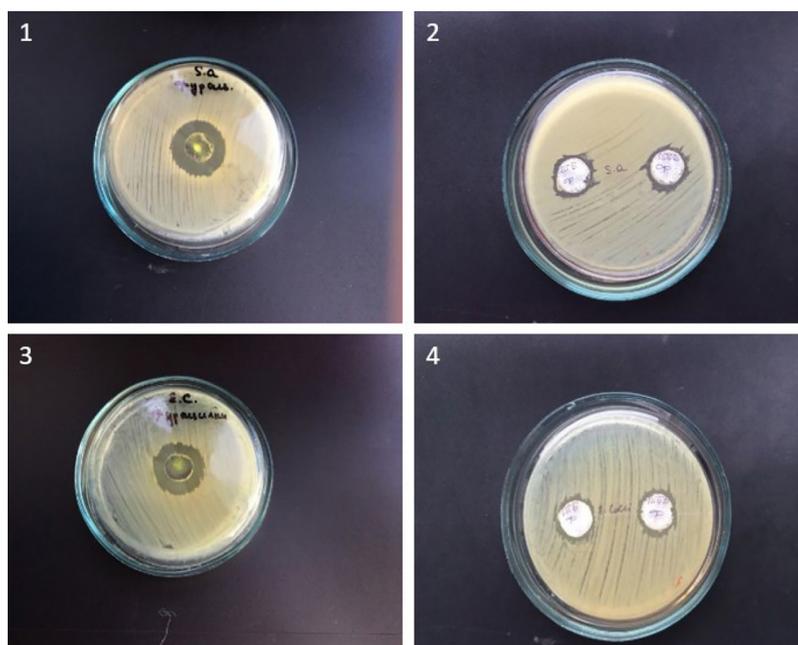


Fig. 4. Zones of growth inhibition of *Staphylococcus aureus* (1, 2) and *Escherichia coli* (3, 4) after the introduction of P(3HB) and P(3HB)-co-P(3HV) microparticles with encapsulated furacilin: 1 – Effect of furacilin on *Staphylococcus aureus*, 2 – P(3HB) and P(3HB)-co-P(3HV) microparticles with encapsulated furacilin, 3 – Effect of furacilin on *Escherichia coli*, 4 – P(3HB) and P(3HB)-co-P(3HV) microparticles with encapsulated furacilin

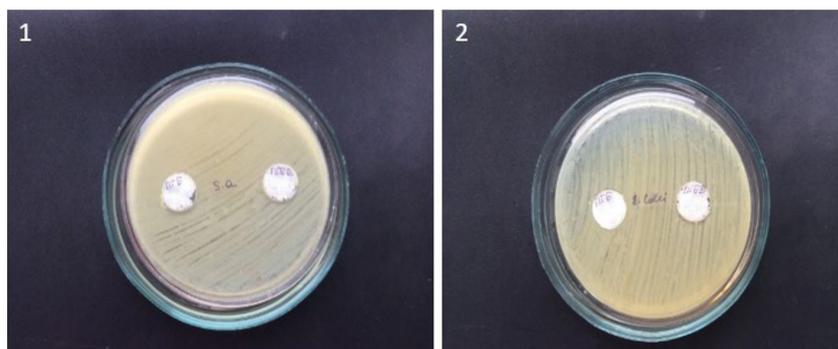


Fig. 5. Zones of growth inhibition of *Staphylococcus aureus* (1) and *Escherichia coli* (2) after the introduction of empty P(3HB) and P(3HB)-co-P(3HV) microparticles

efficiency of encapsulation in polymer matrices, while the encapsulation of miramistin was lower. That was attributed to the structure of the miramistin molecule and its effect on laying of polymer chains, as well as the nature of mixing of the product with the matrix material. The system

for controlled delivery of antiseptic drugs produced in the present study showed better effectiveness compared to available pharmaceutical forms. In general, the study showed satisfactory antibacterial effect and stability of the produced pharmaceutical microparticles in the model medium *in vitro*.

## References

- Anselmo A. C., Mitragotri S. (2014) An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 190: 15–28
- Bonartsev A. P., Yakovlev S. G., Filatova E. V., Soboleva G. M., Makhina T. K., Bonartseva G. A., Shaitan K. V., Popov V. O., Kirpichnikov M. P. (2012) Sustained release of the antitumor drug paclitaxel from poly(3-hydroxybutyrate)-based microspheres. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 6(1): 42–47
- Campos E., Branquinho J., Carreira A. S., Carvalho A., Coimbra P., Ferreira P., Gil M. H. (2013) Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *European Polymer Journal*, 49(8): 2005–2021
- Chernetskaya Y. G., Dedyushko N. A., Trukhachova T. V., Zhebentyaev A. I., Petrov P. T. (2009) Antimicrobial activity of new medications based on hydrogel polymer matrixes. *Pharmacy Bulletin [Vestnik farmatsii]*, 3: 63–75 (in Russian)
- Eke G., Kuzmina A. M., Goreva A. V., Shishatskaya E. I., Hasirci N., Hasirci V. (2014) In vitro and transdermal penetration of PHBV micro/nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(6): 1471–1481
- González E., Herencias C., Prieto M. A. (2020) A polyhydroxyalkanoate-based encapsulating strategy for ‘bioplasticizing’ microorganisms. *Microbial Biotechnology*, 13(1): 185–198
- Grekhneva E. V., Kudryavtseva T. N., Klimova L. G. (2017) Properties of furacilin encapsulated in water-soluble polymers. *Auditorium*, 1: 22–29 (in Russian)
- Grib I. V. (2014) *Production of chitosan microparticles with miramistin by spray drying and a study of their physicochemical properties. Graduate thesis.* Minsk, Belarusian State University, 38 p. (in Russian)

- Imre B., Pukánszky B. (2013) Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends. *European Polymer Journal*, 49(6): 1215–1233
- Iqbal M., Zafar N., Fessi H., Elaissari A. (2015) Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2): 173–190
- Kamaeva S. S., Potselueva L. A. (2010) Development of vaginal films with miramistin for the treatment of inflammatory diseases of the genitals. *In the World of Scientific Discoveries* [V mire nauchnykh otkrytii], 5–2: 83–85 (in Russian)
- Khem S., Small D.M., May B.K. (2016) The behavior of whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry*, 190: 717–723
- Koller M. (2018) Biodegradable and biocompatible polyhydroxy-alkanoates (PHA): auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic applications. *Molecules*, 23(2): 362
- Kosenko R. Yu., Iordanskii A. L., Markin V. S., Arthanarivaran G., Bonartsev A. P., Bonartseva G. A. (2007) Controlled release of antiseptic drug from poly(3-hydroxybutyrate)-based membranes. Combination of diffusion and kinetic mechanisms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 41(12): 652–655
- Kulikouskaya V. I., Egorov D. I., Agabekov V. E. (2015) Fabrication and properties of miramistin-containing calcium pectinate microparticles. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus* [Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi], 59(6): 62–66 (in Russian)
- Lim J., You M., Li J., Li Z. (2017) Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds. *Materials Science & Engineering: C*, 79: 917–929
- Liu Q., Zhang H., Deng B., Zhao X. (2014) Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): structure, property, and fiber. *International Journal of Polymer Science*, 2014: Article ID 374368
- Lizarraga-Valderrama L. R., Panchal B., Thomas C., Boccaccini A. R., Roy I. (2016) Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates. *Biomaterials from nature for advanced devices and therapies*. Neves N.M., Reis R.L. (eds.) Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., p. 337–383
- Murueva A. V., Shershneva A. M., Abanina K. V., Prudnikova S. V., Shishatskaya E. I. (2019) Development and characterization of ceftriaxone-loaded P3HB-based microparticles for drug delivery. *Drying Technology*, 37(9): 1131–1142
- Murueva A. V., Shishatskaya E. I., Kuzmina A. M., Volova T. G., Sinskey A. J. (2013) Microparticles prepared from biodegradable polyhydroxyalkanoates as matrix for encapsulation of cytostatic drug. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(8): 1905–1915
- Ol'khov A. A., Pankova Yu. N., Kosenko R. Yu., Gol'dshtrakh M. A., Markin V. S., Iordanskii A. L. (2018) Controlled-release matrixes for drugs based on polyamide-polyhydroxybutyrate compositions. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 52(1): 77–83
- Ol'khov A. A., Iordanskii A. L., Vlasov S. V., Kosenko R. Yu., Simonova Yu. S., Zaikov G. E., Yarullin A. F. (2012) Matrices for controlled release of furacilin based on polyhydroxybutyrate films modified with shungite. *Bulletin of Kazan Technological University* [Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta], 15(9): 108–111
- Silvestri D. L., McEnery-Stonelake M. (2013) Chlorhexidine: uses and adverse reactions. *Dermatitis*, 24(3): 112–118
- Teo S. Y., Lee S. Y., Rathbone M. J., Gan S. N. (2017) Polymeric materials as platforms for topical drug delivery: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(1): 14–20

Toholka R., Nixon R. (2013) Allergic contact dermatitis to chlorhexidine. *Australasian Journal of Dermatology*, 54(4): 303–306

Zaitsev S. Yu., Tiurina T.G., Zaitseva V.V. (2015) Polymer film based on a copolymer N-vinylpyrrolidone as advanced medical products. *Veterinary, Zootechnics and Biotechnology [Veterinariya, Zootekhnika i Biotekhnologiya]*, 8: 70–76 (in Russian)

Zhang J., Shishatskaya E. I., Volova T. G., da Silva L. F., Chen G.-Q. (2018) Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science & Engineering: C*, 86: 144–150

Zhang Z., Tsai P. C., Ramezanli T., Michniak-Kohn B. B. (2013) Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. *Wiley Interdisciplinary Reviews – Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 5(3): 205–218

EDN: SPGETQ

УДК 577.213.36:622.416.2–057.2:616.24–006

## Polymorphism of Genes Encoding DNA Repair Enzymes in Coal Mine Workers with Lung Cancer

Anna A. Timofeeva<sup>\*a</sup>, Artyom V. Minin<sup>a, b</sup>,  
Marina L. Bakanova<sup>a</sup>, Yana A. Zakharova<sup>a, b</sup>,  
Anastasiya V. Torgunakova<sup>a, b</sup>, Alexandr Y. Prosekov<sup>b</sup>,  
Ruslan A. Titov<sup>a</sup> and Andrey N. Glushkov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS

<sup>b</sup>Kemerovo State University

Kemerovo, Russian Federation

Received 30.09.2021, received in revised form 07.01.2023, accepted 14.03.2024

**Abstract.** In coal mines, workers performing basic production operations underground are exposed to a whole range of both chemical and radiation-induced carcinogenic factors. This leads to a significant increase in the risk of lung cancer in underground mine workers. The likelihood of developing cancer is affected by genetically determined features of the body's defense systems. Specifically, much research has been devoted to the role of inherited variants of genes encoding DNA repair enzymes. However, their polymorphism in coal miners remains largely unexplored. The present study investigated associations of the polymorphism of genes encoding DNA repair enzymes – *hOGGI* (rs1052133), *APEX1* (rs1130409), *XPD* (rs13181), *NBS1* (rs1805794), and *ADPRT1* (rs1136410) – with the risk of developing lung cancer in coal miners. Two hundred and thirteen miners with lung cancer were examined. The control group included 247 healthy miners of the Kemerovo Region (Western Siberia, Kuzbass). Genotyping was performed using allele-specific PCR. The study showed that the following gene variants were associated with the risk of developing cancer: polymorphism of the genes *APEX1* (dominant model: OR<sub>adj</sub>=1.71; CI 95 %: 1.04–2.81), *XPD* (dominant model: OR<sub>adj</sub>=2.12; CI 95 %: 1.30–3.46), and *ADPRT1* (recessive model: OR<sub>adj</sub>=3.00; CI 95 %: 1.08–8.33). The results of this work suggest the relationship between the polymorphism of the genes of DNA repair enzymes and the risk of lung cancer in coal mine workers.

**Keywords:** miners, lung cancer, DNA repair genes.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: annateam86@gmail.com

ORCID: 0000-0002-9063-0158 (Timofeeva A.); 0000-0002-5839-5194 (Minin A.); 0000-0002-1238-2427 (Bakanova M.); 0000-0003-0754-306X (Zakharova Y.); 0000-0001-5643-5001 (Torgunakova A.); 0000-0002-5485-9318 (Titov R.); 0000-0002-8560-6719 (Glushkov A.)

**Acknowledgements.** The study was carried out as part of State Assignment No. AAA–A21–121011590009–9.

Citation: Timofeeva A. A., Minin A. V., Bakanova M. L., Zakharova Y. A., Torgunakova A. V., Prosekov A. Y., Titov R. A., Glushkov A. N. Polymorphism of genes encoding DNA repair enzymes in coal mine workers with lung cancer. *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2024, 17(1), 33–44. EDN: SPGETQ



## Полиморфизм генов ферментов репарации ДНК у работников угольных шахт, больных раком легкого

А. А. Тимофеева<sup>а</sup>, А. В. Минин<sup>а, б</sup>, М. Л. Баканова<sup>а</sup>,  
Я. А. Захарова<sup>а, б</sup>, А. В. Торгунакова<sup>а, б</sup>,  
А. Ю. Просеков<sup>б</sup>, Р. А. Титов<sup>а</sup>, А. Н. Глушков<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН

<sup>б</sup>Кемеровский государственный университет

Российская Федерация, Кемерово

**Аннотация.** В угольных шахтах на работников, выполняющих основные производственные операции под землей, воздействует целый комплекс канцерогенных факторов как химической, так и радиационной природы. Это приводит к значительному увеличению риска рака легкого у рабочих-подземщиков. Вероятность развития онкопатологии определяется генетически детерминированными особенностями защитных систем организма. В частности, активно исследуется роль унаследованных вариантов генов, кодирующих ферменты репарации ДНК. Однако их полиморфизм у шахтеров угольных шахт остается практически не изученным. Были изучены ассоциации полиморфизма генов ферментов репарации: *hOGG1* (rs1052133), *APEX1* (rs1130409), *XPB* (rs13181), *NBS1* (rs1805794) и *ADPR1* (rs1136410) с риском развития рака легкого у 213 шахтеров угольных шахт. В группу контроля вошло 247 здоровых работников угледобывающих предприятий Кемеровской области (Западная Сибирь, Кузбасс). Генотипирование проводили с помощью аллель-специфической ПЦР. Обнаружено, что изученные варианты генов были связаны с риском развития рака: полиморфизм гена *APEX1* (доминантная модель: ORadj=1,71; CI 95 %: 1,04–2,81), *XPB* (доминантная модель: ORadj=2,12; CI 95 %: 1,30–3,46), *ADPR1* (рецессивная модель: ORadj=3,00; CI 95 %: 1,08–8,33). Результаты проведенной работы указывают на взаимосвязь между полиморфизмом генов ферментов репарации ДНК и риском рака легкого у работников угольных шахт.

**Ключевые слова:** шахтеры, рак легкого, гены репарации ДНК.

**Благодарности.** Исследование выполнено в рамках государственного задания № AAA–A21–121011590009–9.

Цитирование: Тимофеева А. А. Полиморфизм генов ферментов репарации ДНК у работников угольных шахт, больных раком легкого / А. А. Тимофеева, А. В. Минин, М. Л. Баканова, Я. А. Захарова, А. В. Торгунакова, А. Ю. Просеков, Р. А. Титов, А. Н. Глушков // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(1). С. 33–44. EDN: SPGETQ

## Введение

На сегодняшний день наблюдается устойчивая тенденция роста онкологических заболеваний. Рак легкого входит в число лидеров по распространенности и является, согласно мировой статистике, основной причиной смертности пациентов (Sung et al., 2021).

В ходе проведения обширных эпидемиологических исследований было установлено, что курение сигарет является основной причиной формирования рака легкого, увеличивая риск развития заболевания более чем в 5 раз (Yang et al., 2021). Тем не менее только у небольшого числа курящих людей развивается данная патология, примерно 25 % пациентов не были курильщиками (GLOBCAN, 2012). Другим фактором риска развития рака легкого является воздействие таких загрязнителей воздушной среды, как частицы угольной пыли, кварца, полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), тяжелые металлы и природные радиоактивные вещества (Sung et al., 2021). Высокая концентрация этих агентов характерна для угледобывающих предприятий, что, в свою очередь, может привести к увеличению уровня повреждения ДНК и риска развития онкологических заболеваний у рабочих данных производств (de Souza et al., 2020; Minina et al., 2015, 2020; León-Mejía et al., 2016; Sinitsky et al., 2016). Многочисленные исследования показывают, что у работников угольных шахт чаще развивается рак легкого, чем у лиц, непосредственно не связанных с угледобычей (Cortes-Ramirez et al., 2018; Ponciano-Rodríguez et al., 2021; Taeger et al., 2015).

Проведенные общегеномные исследования показали ассоциацию повышенного риска развития рака легкого с 45 локусами восприимчи-

вости, каждый из которых имеет различные уровни доказательств и предполагаемые причинные гены, наиболее значимые из которых были обнаружены для однонуклеотидных полиморфизмов, расположенных в регионах 15q25, 5p15 и 6p21 (Bossé, Amos, 2018; Wang et al., 2020). На сегодняшний день опубликовано более 1000 работ, в которых отражено изучение взаимосвязи генов-кандидатов с предрасположенностью к раку легкого, но многие из этих исследований являются предварительными или спорными.

К числу ферментов, играющих важную роль в резистентности клеток к повреждениям ДНК, относятся белки, осуществляющие репарацию ДНК, например, APEX1, hOGG1, ADPRT1, XPD и NBS 1 (AlMutairi et al., 2015; Wang et al., 2017; Chuang et al., 2017).

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы является изучение потенциальных взаимосвязей между вариантами генов *hOGG1* (rs1052133), *APEX1* (rs1130409), *XPD* (rs13181), *NBS 1* (rs1805794) и *ADPRT1* (rs1136410) и риском развития рака легкого у шахтеров, работавших на угледобывающих шахтах России.

## Материалы и методы

В состав исследуемой группы вошло 213 шахтеров, работавших на угольных шахтах Кемеровской области, с первично диагностированным раком легкого (РЛ), поступивших на лечение в Кемеровский областной онкологический диспансер (Кемерово, Российская Федерация). Образцы крови у больных людей были взяты перед всеми диагностическими и терапевтическими процедурами. Все пациенты были обследованы врачами Кемеровско-

го областного онкологического диспансера по полному комплексу диагностических методик, что позволило установить точный патоморфологический диагноз у каждого человека. В контрольную группу было включено 247 здоровых мужчин, работающих на предприятии угольного цикла и не имевших признаков онкологических заболеваний. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинской декларацией (применялись этические принципы медицинских исследований с изменениями, представленными в 2000 году). Дизайн исследования был одобрен Комитетом по этике Федерального исследовательского центра угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук. Перед сбором данных и образцов крови все участники подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Характеристика обследованных групп представлена в табл. 1. Критерии включения: европеоиды мужского пола, проживающие в Кемеровской области, работники угольных шахт Кузбасса (стаж работы под землей не менее 10 лет). Критерии исключения: психические, наследственные, сердечно-сосудистые, аллергические, аутоиммунные заболевания, а также наличие родственников (первой/второй степени родства) с онкологическими заболеваниями.

Забор образцов цельной крови осуществляли из локтевой вены с использованием разовых

вакуумных систем (пробирки «Вакутейнер») с антикоагулянтом 0,25 мМ ЭДТА-Na, затем переносили в пробирки типа «Эппендорф».

ДНК выделяли из периферической крови с помощью стандартного метода фенол-хлороформной экстракции. Клетки крови были выделены и лизированы, для гидролиза белка использовалась протеиназа К (СибЭнзим, Новосибирск, Российская Федерация). Затем ДНК экстрагировали с помощью фенола и хлороформа, и осаждали этанолом.

Анализ полиморфных вариантов генов проводили методом аллель-специфической ПЦР с использованием наборов «SNP-экспресс» (НПФ «Литех», г. Москва) на амплификаторах «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) (табл. 2). Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли с помощью горизонтального электрофореза в 3 % агарозном геле, после окончания которого гель окрашивали раствором бромистого этидия и визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

Для статистической обработки данных использовали пакеты прикладных программ SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) и STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., Талса, Оклахома, США).

С помощью доступного онлайн-ресурса (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwal.pl>) проводили оценку частоты редкого аллеля, соответствие

Таблица 1. Характеристика обследованных групп

Table 1. Characterization of the groups examined in the study

Показатели		Больные РЛ	Контроль
Средний возраст, лет (mean ± S.D.)		61,58 ± 7,58	58,81 ± 9,14
Количество человек (N)		213	247
Курение (статус)	Курящие	183	221
	Некурящие	30	26
Стаж работы, лет (mean ± S.D.)		24,03 ± 10,38	20,57 ± 8,93

Таблица 2. Характеристика локусов и праймеров аллель-специфической ПЦР

Table 2. Characterization of loci and allele-specific PCR primers

Ген	Полиморфный локус (Ref SNP)	Аллели	Праймеры (5'→3')
<i>APEX1</i>	444 T>G (rs1130409)	T, G	F: 5'-attgaggtctccacacagcaca-3' R: 5'-aattctgtttcatttctatagcgag-3'
<i>XPD</i>	2251 T>G (rs13181)	T, G	F: 5'-tcaaacatcctgtccctact-3' R: 5'-ctgccgattaaggtgtgga-3'
<i>NBS 1</i>	535 C>G (rs1805794)	C, G	F: 5'-gcagtgaccaagaccgacttcta-3' R: 5'-tgaggttacctcagtgccatttact-3'
<i>ADPRT1</i>	2285 T>C (rs1136410)	T, C	F: 5'-ctgctgcctatacagtcacttt-3' R: 5'-gtggccatcacattcgtcagat-3'
<i>hOGG1</i>	977 C>G (rs1052133)	C, G	F: 5'-ggaaggtgctggggaat-3' R: 5'-actgtcactagtctcaccag-3'

распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга ( $\chi^2$ ), а также анализ различий между группами по частотам аллелей и генотипов. Статистически значимыми различия считали при  $p < 0,05$ . Логистический регрессионный анализ с расчетом отношения шансов (OR) и 95 % доверительных интервалов проводили с учетом таких факторов, как возраст и статус курения. Для выбора лучшей модели из всех статистически значимых использовали информационный критерий Акайке (AIC), имеющий наименьшее значение.

Для исследования межгенных взаимодействий использовали метод Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) (Moore et al., 2006), позволяющий оценивать все возможные модели комбинаций SNP. Вклад каждого гена и/или их взаимодействия оценивается величиной  $H$  (снятой неопределённостью в терминах теории информации, энтропией) и выражается в %. Для проведения данного анализа использовали программное обеспечение MDR 3.2.0 (Computational Genetics Laboratory, Philadelphia, Pennsylvania, USA).

## Результаты

Изучение полиморфных вариантов генов ферментов репарации ДНК было проведено

в когорте шахтеров, больных раком легкого, и у здоровых работников угледобывающих предприятий близкого возраста. Распределение частот аллелей и генотипов в изученных группах соответствует равновесию Харди-Вайнберга, а также соответствующим показателям, наблюдаемым в европейских популяциях (ensemble: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens); Bastos et al., 2009). Статистически значимых отличий в группах пациентов с РЛ, различающихся по стадиям заболевания (I и II стадии против III и IV), локализации опухоли, метастазированию, выявлено не было. Были выявлены, с учетом поправки на множественные сравнения (поправка Бонферрони), статистически значимые различия в распределении вариантов гена *XPD* (rs13181) в группе больных РЛ по сравнению со здоровыми обследованными (табл. 3).

Анализ различных моделей наследования с поправкой на статус курения и возраст позволил выявить несколько интересных ассоциаций. Взаимосвязь риска формирования рака легкого была выявлена с полиморфным локусом *XPD* 2251 T>G в группе шахтеров с РЛ (доминантная модель:  $OR_{adj}=2,12$ ; CI 95 %: 1,30–3,46;  $P_{adj}=0,003$ ), в группе курящих шахтеров обнаружена ассоциация риска развития

Таблица 3. Распределение частот аллелей и генотипов генов репарации ДНК в изученных группах

Table 3. Frequency distribution of genotypes and alleles of DNA repair genes in the studied groups

Локусы и генотипы	Генотипы и аллели	Больные РЛ, чел. (%)	Контроль, чел. (%)	P (df)**
<i>ADPRT1</i> (rs1136410)	TT/TC/CC	127 (59,62) / 69 (32,39) / 17 (7,98)	159 (64,37) / 74 (29,96) / 14 (5,67)	0,58 (2)
	T/C	161 (75,81) / 52 (24,18)	196 (79,35) / 51 (20,65)	0,39 (1)
	P exact*	0,24	0,40	
<i>hOGGI</i> (rs1052133)	CC/CG/GG	112 (52,58) / 86 (40,38) / 15 (7,04)	145 (58,70) / 92 (37,25) / 10 (4,05)	0,32 (2)
	C/G	155 (72,77) / 58 (27,23)	191 (77,32) / 56 (22,67)	0,31 (1)
	P exact*	0,96	0,62	
<i>APEX1</i> (rs1130409)	TT/TG/GG	67 (31,46) / 99 (46,48) / 47 (22,07)	98 (39,68) / 114 (46,15) / 35 (14,17)	0,06 (2)
	T/G	117 (54,7) / 96 (45,31)	155 (62,75) / 92 (37,25)	0,11 (1)
	P exact*	0,66	0,98	
<i>XPD</i> (rs13181)	TT/TG/GG	62 (29,11) / 110 (51,64) / 41 (19,25)	118 (47,77) / 98 (39,68) / 31 (12,55)	<b>0,0003</b> <sup>1</sup> (2)
	T/G	117 (54,93) / 96 (45,07)	167 (67,61) / 80 (32,39)	<b>0,007</b> (1)
	P exact*	0,82	0,34	
<i>NBS1</i> (rs1805794)	CC/CG/GG	91 (42,72) / 94 (44,13) / 28 (13,15)	107 (43,32) / 99 (40,08) / 41 (16,60)	0,59 (2)
	C/G	138 (64,79) / 75 (35,21)	157 (63,36) / 90 (36,64)	0,86 (1)
	P exact*	0,89	0,10	

\*Соответствие равновесию Харди-Вайнберга;

\*\*Отличия в распределении частот аллелей и генотипов между группами шахтеров с раком легкого и здоровыми донорами

<sup>1</sup>OR = 2,12 (1,30–3,46) для доминантной модели, критерий Акайке (AIC) = 426.

РЛ с генотипами *XPD* 2251 TG и *XPD* 2251 GG (OR<sub>adj</sub>=2,62; CI 95 %: 1,48–4,63; OR<sub>adj</sub>=2,15; CI 95 %: 1,02–4,50 соответственно). В группе некурящих пациентов взаимосвязи риска формирования онкопатологий легкого с полиморфизмом гена *XPD* 2251 T>G не выявлено.

Связь риска развития РЛ и вариантов гена *APEX1* 444 T>G была обнаружена у шахтеров в доминантной модели наследования (OR<sub>adj</sub>=1,71; CI 95 %: 1,04–2,81; P<sub>adj</sub>=0,033). Отдельно в группах курящих и некурящих работников, больных РЛ, не было выявлено взаимосвязи риска формирования онкопатологий легкого с полиморфизмом гена *APEX1* 444 T>G.

Связь полиморфного локуса *ADPRT1* 2285 T>C с риском развития РЛ в группе работников угольных шахт реализовалась в рецессивной модели наследования (OR<sub>adj</sub>=3,00; CI 95 %: 1,08–8,33; P<sub>adj</sub>=0,032), в когорте курящих шахтеров с риском формирования онкопатологий легкого выявлена ассоциация генотипа гена *ADPRT1* 2285 CC (OR<sub>adj</sub>=3,01; CI 95 %: 1,07–8,50). В группе некурящих пациентов взаимосвязи риска формирования онкопатологий легкого с полиморфизмом гена *ADPRT1* 2285 T>C не обнаружено.

С помощью метода Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) была найдена наиболее оптимальная 3-х локусная модель

Таблица 4. Анализ межгенных взаимодействий при формировании РЛ у шахтеров

Table 4. Analysis of intergenic interactions in the development of lung cancer in miners

Сочетания полиморфных локусов модели	Tr.Bal.Acc.	Test. Bal.Acc.	Sign Test (P)	Se	Sp	CVC	Pre.
<i>hOGG1</i> (rs1052133) <i>NBS1</i> (rs1805794) <i>XPB</i> (rs13181)	0,632	0,539	<0,0001	0,822	0,433	7/10	0,556

Tr. Bal.Acc. – Training balanced accuracy; Test.Bal.Acc. – Testing balanced accuracy; Sign Test (P) – Significant test (P); Se. – Sensitivity; Sp. – Specificity; CVC – Cross-validation consistency; Pre. – Precision Significant test (P)

межгенных взаимодействий, которая характеризовалась высокой точностью, минимальной ошибкой предсказания и максимальной статистической оценкой воспроизводимости (табл. 4).

Кластерный анализ показал тесное взаимодействие и синергизм эффектов между локусами *hOGG1* 977 C>G и *NBS1* 1535 C>G, между локусами *XPB* 2251 T>G и *APEX1* 444 T>G наблюдалось дублирование эффектов (рис. 1).

Наибольший вклад в представленной модели в развитие заболевания определен для локуса *APEX1* (rs1130409 T>G) (H=1,49 %) и *XPB* (rs13181 T>G) (H=1,47 %).

## Обсуждение

Развитию онкологических заболеваний легкого способствует множество факторов, к их числу относятся и факторы внешней среды, канцерогенный потенциал которых во многом зависит от эффективности белков, участвующих в репарации ДНК.

Известно, что распределение вариантов генов и их ассоциации с заболеваниями являются этноспецифичными. Большинство исследований, изучающих роль полиморфизма генов репарации ДНК в формировании риска рака легкого у людей, профессионально контактирующих с промышленными канцерогенами, были проведены в странах Азии. Это

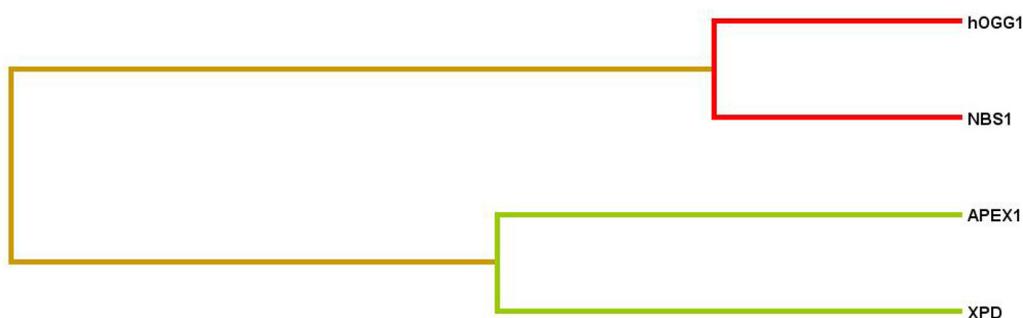


Рис. 1. Дендрограмма межгенных взаимодействий при формировании рака легкого у шахтеров. Короткие линии указывают на сильное взаимодействие генных локусов; длинные – на слабую связь; зеленый цвет указывает на дублирование эффектов между локусами; коричневый цвет – на независимость эффектов отдельных локусов, красный – синергизм эффектов между локусами

Fig. 1. Cluster analysis of the gene-gene interactions in the development of lung cancer in miners. The short lines denote strong interaction between gene loci; the long lines indicate weak interaction; the green color denotes duplication of effects between loci, brown – independent effects of indicated allelic variants, red – synergy of effects between loci

важно учитывать при проведении сравнений и делать поправку на данный конфаундер. С другой стороны, этот аспект может отражать новизну проведенного исследования: впервые получены результаты, характеризующие данные ассоциации у европеоидов-шахтеров.

Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза является одним из важных ферментов, участвующих в репарации ДНК. Полиморфизм гена *APEX1* (rs1130409 T>G) приводит к замене Asp на Glu в 148 кодоне, что, в свою очередь, снижает способность белка корректно взаимодействовать с другими ферментами и ухудшает процесс репарации ДНК в целом (Nadi et al., 2000). Обнаруженная в ходе проведенного анализа статистически значимая ассоциация полиморфизма гена *APEX1* с увеличением риска развития онкологических заболеваний легкого согласуется с результатами работ других исследователей (AlMutairi et al., 2015). В частности, вариантный аллель гена *APEX1* статистически значимо связан с высоким риском рака легкого у рабочих Китая, контактировавших с высокими уровнями ПАУ (Li et al., 2015). В исследовании Chen et al. (2013) прямой взаимосвязи полиморфизма *APEX1* (rs1130409 T>G) с риском развития РЛ не выявлено, но было сделано предположение об усилении влияния курения на риск развития рака легкого у носителей минорного аллеля данного гена.

Одним из важнейших компонентов системы эксцизионной репарации оснований является ген *ADPRT1*, необходимый для поддержания целостности генома и взаимодействия с различными белками, входящими во множественные пути восстановления ДНК. Результаты молекулярно-генетических исследований, отражающих связь полиморфизма гена *ADPRT1* 2285 T>C с увеличением риска развития РЛ, достаточно противоречивы. Так, не было выявлено связи полиморфизма гена *ADPRT1* 2285 T>C с увеличением

риска развития РЛ в группах латиноамериканских и афроамериканских жителей США (Chang et al., 2009). В то же время в исследованиях, проведенных среди жителей Китая, обнаружена ассоциация минорного аллеля гена *ADPRT1* с увеличением риска развития онкозаболеваний легкого (Qin et al., 2014; Wang et al., 2021), что согласуется и с результатами нашей работы.

Другим важным участником репарации ДНК является ген *XPD*, участвующий в эксцизионной репарации оснований. В ходе проведенного анализа была выявлена взаимосвязь между полиморфизмом гена *XPD* (rs13181 T>G) и увеличением риска развития РЛ у работников угледобывающих предприятий. Установлено, что вариантный аллель гена *XPD* связан со снижением эффективности репарации ДНК (Singh et al., 2015), что согласуется с рядом работ. Так, была обнаружена ассоциация данного полиморфизма с увеличением риска развития рака легкого среди курящих и некурящих жителей Европы и Азии (Zienolddiny et al., 2006; Feng et al., 2012; Sarlinova et al., 2015; Wang et al., 2017; Wu et al., 2014; Tan et al., 2017). Продукт гена *XPD* участвует в процессах репарации, удаляющих все возможные повреждения ДНК, в том числе и образующиеся под воздействием ПАУ, что обуславливает тесную взаимосвязь и дублирование эффектов между локусами *APEX1* (rs1130409 T>G) и *XPD* (rs13181 T>G), обнаруженные в результате проведения кластерного анализа.

Одним из важных путей репарации ДНК является путь репарации двойных разрывов нитей ДНК, к числу ключевых ферментов которого принадлежит продукт гена *NBS 1*, участвующий в обнаружении двуцепочечных разрывов ДНК, передачи сигналов и репарации путем гомологичной рекомбинации, поддержании теломер. Трансверсия С на G,

приводящая к замене глутаминовой кислоты на глутамин (Glu185Gln, rs1805794) широко изучалась в контексте ее связи с риском развития онкологических заболеваний легкого, но результаты этих работ достаточно противоречивы. В результате проведенного нами анализа не было выявлено ассоциаций вариантов гена *NBS 1* 535 C>G с увеличением риска развития РЛ у шахтеров. У жителей Китая была обнаружена взаимосвязь частоты встречаемости минорного аллеля гена *NBS 1* и повышения риска развития рака легких (Lan et al., 2005), но у жителей Тайваня столь явной закономерности не наблюдалось, ассоциация генотипа *NBS 1* G553G с увеличением риска развития онкологических заболеваний легких была обнаружена только в группе курящих мужчин (Chuang et al., 2017). В группе европеоидов подобной взаимосвязи с риском развития немелкоклеточной карциномы легких выявлено не было (Zienolddiny et al., 2006).

Ген *hOGG1* кодирует ключевой фермент эксцизионной репарации оснований, бифункциональную ДНК-гликозилазу. Установлено, что белок OGG1-Cys326 более чувствителен к окислению, чем OGG1-Ser326 вариант, что связано с уменьшенной активностью фермента в условиях окислительного стресса (Simonelli et al., 2013). Метаанализ данных показал, что у обладателей вариантных аллелей 326Cys выше заболеваемость РЛ, но показатели существенно отличаются между курящими и некурящими, в зависимости от гистологического типа опухоли, этноса и размера выборки (Duan et al., 2012). Результаты проведенного нами исследования не показали связи полиморфизма гена *hOGG1* 977 C>G с увеличением риска развития РЛ, что согласуется с данными, полученными при обследовании рабочих в Словакии, подвергающихся воздействию хрома, а также результатами другого метаанализа (Sarlinova et al., 2015; Geng et al., 2014).

Результаты проведенной работы частично согласуются с данными, полученными ранее при обследовании пациентов, проживающих на территории Кемеровской области. В отличие от лиц, профессионально связанных с процессами добычи угля, у жителей угледобывающих территорий была обнаружена взаимосвязь увеличения риска развития онкологических заболеваний легкого только с полиморфизмом гена *XPB* (rs13181 T>G).

Кроме того, проведенный с помощью метода MDR анализ показал иную модель межгенных взаимодействий при формировании РЛ у пациентов, не связанных с профессиональной деятельностью по добыче угля, чем у больных шахтеров. Так, у жителей Кемеровской области модель включала в себя локусы *XRCC 1* (rs25487), *NBS 1* (rs1805794), *hOGG1* (rs1052133) и *XPB* (rs17655), в то время как у шахтеров, больных РЛ, она включала локусы *hOGG1* (rs1052133), *XPB* (rs13181) и *NBS 1* (rs1805794). Возможно, эти различия связаны с отличающимся количественным и качественным составом загрязняющих агентов, воздействующих на работников угольных шахт и жителей угледобывающей территории (Minina et al., 2019).

## Заключение

Полученные в ходе проведенной работы результаты указывают на связь между комбинациями полиморфных вариантов в изученных генах и риском развития рака легкого у пациентов, работавших на угледобывающих предприятиях. Развитие болезни определяется взаимодействием генов, осуществляющих репарацию повреждений ДНК (*APEX1*, *ADPRT1* и *XPB*), причем эффекты их взаимодействия реализуются на фоне действия средовых факторов – комплексного воздействия производственной среды и курения.

## Список литературы / References

- AlMutairi F., Pathan A. A., Alanazi M., Shalaby M., Alabdulkarim H. A., Alamri A., Al Naeem A., Elrobb M., Shaik J.P., Khan W., Khan Z., Parine N.R. (2015) Association of DNA repair gene APE 1 Asp148Glu polymorphism with breast cancer risk. *Disease Markers*, 2015: 869512
- Bastos H.N., Antao M.R., Silva S.N., Azevedo A.P., Manita I., Teixeira V., Pina J.E., Gil O.M., Ferreira T.C., Limbert E., Rueff J., Gaspar J.F. (2009) Association of polymorphisms in genes of the homologous recombination DNA repair pathway and thyroid cancer risk. *Thyroid*, 19(10): 1067–1075
- Bossé Y., Amos C.I. (2018) A decade of GWAS results in lung cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 27(4): 363–379
- Chang J.S., Wrensch M.R., Hansen H.M., Sison J.D., Aldrich M.C., Quesenberry C.P. Jr., Seldin M.F., Kelsey K.T., Wiencke J.K. (2009) Base excision repair genes and risk of lung cancer among San Francisco Bay Area Latinos and African-Americans. *Carcinogenesis*, 30(1): 78–87
- Chen W.C., Tsai C.W., Hsia T.C., Chang W.S., Lin L.Y., Liang S.J., Tu C.Y., Cheng W.E., Chen H.J., Wang S.M., Bau D.T. (2013) The contribution of DNA apurinic/aprimidinic endonuclease genotype and smoking habit to Taiwan lung cancer risk. *Anticancer Research*, 33(6): 2775–2778
- Chuang C.L., Wang C.H., Hsu C.H., Hsiao C.L., Chen G.L., Yen S.T., Li H.T., Chang W.S., Tsai C.W., Wang S.C., Bau D.T. (2017) Contribution of double-strand break repair gene Nijmegen breakage syndrome 1 genotypes, gender difference and smoking status to Taiwanese lung cancer. *Anticancer Research*, 37(5): 2417–2423
- Cortes-Ramirez J., Naish S., Sly P.D., Jagals P. (2018) Mortality and morbidity in populations in the vicinity of coal mining: a systematic review. *BMC Public Health*, 18(1): 721
- de Souza M.R., Rohr P., Kahl V.F. S., Kvitko K., Cappetta M., Lopes W.M., Simon D., da Silva J. (2020) The influence of polymorphisms of xenobiotic-metabolizing and DNA repair genes in DNA damage, telomere length and global DNA methylation evaluated in open-cast coal mining workers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189: 109975
- Duan W.X., Hua R.X., Yi W., Shen L.J., Jin Z.X., Zhao Y.H., Yi D.H., Chen W.S., Yu S.Q. (2012) The association between OGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility: a meta-analysis of 27 studies. *PLoS One*, 7(4): e35970
- Feng Z., Ni Y., Dong W., Shen H., Du J. (2012) Association of ERCC 2/XPD polymorphisms and interaction with tobacco smoking in lung cancer susceptibility: a systemic review and meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, 39(1): 57–69
- Geng P., Yao J., Zhu Y. (2014) hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility: a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, 41(4): 2299–2306
- GLOBCAN (2012) <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/lung.asp> (GLOBCAN 2012, IARC, Section of Cancer Information) Accessed 8 Aug 2017
- Hadi M.Z., Coleman M.A., Fidelis K., Mohrenweiser H.W., Wilson D.M. (2000) Functional characterization of ApeI variants identified in the human population. *Nucleic Acids Research*, 28(20): 3871–3879
- Lan Q., Shen M., Berndt S.I., Bonner M.R., He X., Yeager M., Welch R., Keohavong P., Donahue M., Hainaut P., Chanock S. (2005) Smoky coal exposure, NBS 1 polymorphisms, p53 protein accumulation, and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Lung Cancer*, 49(3): 317–323

León-Mejía G., Quintana Sosa M., Rohr P., Kvitko K., Henriques J.A. P., da Silva J. (2016) Occupational exposure to coal, genotoxicity, and cancer risk. *Environmental health risk – Hazardous factors to living species*. Larramendy M.L., Soloneski S. (eds.) InTech, p. 191–209

Li X., Wei J., Xu P., Yin X., Hu D., Zhang X., Liu L., Zhang K., Zhou C., Wang T., Zhang X., He M., Wu T., Yang M., Guo H. (2015) The interaction of APEX1 variant with polycyclic aromatic hydrocarbons on increasing chromosome damage and lung cancer risk among male Chinese. *Molecular Carcinogenesis*, 54(S 1): E 103–E 111

Minina V.I., Kulemin Iu. E., Tolotchko T.A., Meĭer A.V., Savtchenko I.A., Volobaev V.P., Gafarov N.I., Semenikhina M.V. (2015) Genotoxic effects of occupational environment in Kuzbass miners. *Meditsina Truda I Promyshlennaya Ekologiya*, 5: 4–8 (in Russian)

Minina V.I., Bakanova M.L., Soboleva O.A., Ryzhkova A.V., Titov R.A., Savchenko Y.A., Sinitsky M.Y., Voronina E.N., Titov V.A., Glushkov A.N. (2019) Polymorphisms in DNA repair genes in lung cancer patients living in a coal-mining region. *European Journal of Cancer Prevention*, 28(6): 522–528

Minina V.I., Savchenko Y.A., Bakanova M.L., Ryzhkova A.V., Sokolova A.O., Meyer A.V., Tolochko T.A., Voronina E.N., Druzhinin V.G., Glushkov A.N. (2020) Chromosomal instability and genetic polymorphism in miners and workers of coal thermal power plants. *Russian Journal of Genetics*, 56(4): 470–480

Moore J.H., Gilbert J.C., Tsai C.T., Chiang F.T., Holden T., Barney N., White B.C. (2006) A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *Journal of Theoretical Biology*, 241(2): 252–261

Ponciano-Rodríguez G., Gaso M.I., Armienta M.A., Trueta C., Morales I., Alfaro R., Segovia N. (2021) Indoor radon exposure and excess of lung cancer mortality: the case of Mexico-an ecological study. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(1): 221–234

Qin Q., Lu J., Zhu H., Xu L., Cheng H., Zhan L., Yang X., Zhang C., Sun X. (2014) PARP-1 Val762Ala polymorphism and risk of cancer: a meta-analysis based on 39 case-control studies. *PLoS One*, 9(5): e98022

Sarlinova M., Majerova L., Matakova T., Musak L., Slovakova P., Skereňová M., Kavcová E., Halašová E. (2015) Polymorphisms of DNA repair genes and lung cancer in chromium exposure. *Advances in experimental medicine and biology (book series). Vol 833. Lung cancer and autoimmune disorders*. Pokorski M. (ed.) Springer, Cham, p. 1–8

Simonelli V., Camerini S., Mazzei F., Van Loon B., Allione A., D’Errico M., Barone F., Minoprio A., Ricceri F., Guarrera S., Russo A., Dalhus B., Crescenzi M., Hübscher U., Bjørås M., Matullo G., Dogliotti E. (2013) Genotype-phenotype analysis of S 326C OGG1 polymorphism: a risk factor for oxidative pathologies. *Free Radical Biology & Medicine*, 63: 401–409

Singh A., Compe E., Le May N., Egly J.M. (2015) TFIIH subunit alterations causing xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy specifically disturb several steps during transcription. *American Journal of Human Genetics*, 96(2): 194–207

Sinitsky M.Y., Minina V.I., Gafarov N.I., Asanov M.A., Larionov A.V., Ponassenko A.V., Volobaev V.P., Druzhinin V.G. (2016) Assessment of DNA damage in underground coal miners using the cytokinesis-block micronucleus assay in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 31(6): 669–675

Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3): 209–249

Taeger D., Pesch B., Kendzia B., Behrens T., Jöckel K. H., Dahmann D., Siemiatycki J., Kromhout H., Vermeulen R., Peters S., Olsson A., Brüske I., Wichmann H. E., Stücker I., Guida F., Tardón A., Merletti F., Mirabelli D., Richiardi L., Pohlmann H., Ahrens W., Landi M. T., Caporaso N., Pesatori A. C., Mukeriyana A., Szeszenia-Dabrowska N., Lissowska J., Gustavsson P., Field J., Marcus M. W., Fabianova E., 't Mannetje A., Pearce N., Rudnai P., Bencko V., Janout V., Dumitru R. S., Foretova L., Forastiere F., McLaughlin J., Paul Demers P. D., Bueno-de-Mesquita B., Schüz J., Straif K., Brüning T. (2015) Lung cancer among coal miners, ore miners and quarrymen: smoking-adjusted risk estimates from the synergy pooled analysis of case-control studies. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 41(5): 467–477

Tan L. M., Qiu C. F., Zhu T., Jin Y. X., Li X., Yin J. Y., Zhang W., Zhou H. H., Liu Z. Q. (2017) Genetic polymorphisms and platinum-based chemotherapy treatment outcomes in patients with non-small cell lung cancer: a genetic epidemiology study based meta-analysis. *Scientific Reports*, 7(1): 5593

Wang J., Liu Q., Yuan S., Xie W., Liu Y., Xiang Y., Wu N., Wu L., Ma X., Cai T., Zhang Y., Sun Z., Li Y. (2017) Genetic predisposition to lung cancer: comprehensive literature integration, meta-analysis, and multiple evidence assessment of candidate–gene association studies. *Scientific Reports*, 7(1): 8371

Wang L., Zhu M., Wang Y., Fan J., Sun Q., Ji M., Fan X., Xie J., Dai J., Jin G., Hu Z., Ma H., Shen H. (2020) Cross-cancer pleiotropic analysis reveals novel susceptibility loci for lung cancer. *Frontiers in Oncology*, 9: 1492

Wang Y., Xia X. B., Tang H. Z., Cai J. R., Shi X. K., Ji H. X., Yan X. N., Xu T. (2021) Association of T2285C polymorphism in PARP1 gene coding region with its expression, activity and NSCLC risk along with prognosis. *Mutagenesis*, 36(4): 281–293

Wu K. G., He X. F., Li Y. H., Xie W. B., Huang X. (2014) Association between the XPD/ERCC 2 Lys751Gln polymorphism and risk of cancer: evidence from 224 case-control studies. *Tumour Biology*, 35(11): 11243–11259

Yang X., Man J., Chen H., Zhang T., Yin X., He Q., Lu M. (2021) Temporal trends of the lung cancer mortality attributable to smoking from 1990 to 2017: A global, regional and national analysis. *Lung Cancer*, 152: 49–57

Zienolddiny S., Campa D., Lind H., Ryberg D., Skaug V., Stangeland L., Phillips D. H., Canzian F., Haugen A. (2006) Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*, 27(3): 560–567

EDN: OIPJJV

УДК 519–7; 57.065; 581.1.577.21

## Virtual *In Silico* PCR in Two-Dimensional Format as a Tool for Elucidating Phylogenetic Relationship in Allopolyploid Forms with Wheats and Their Wild Relatives *Aegilops* Used as an Example

Olga Yu. Kiryanova\*<sup>a</sup>,

Azat R. Kuluev<sup>b</sup>, Irek M. Gubaydullin<sup>a, c</sup>,

Bulat R. Kuluev<sup>b</sup>, Alexey V. Chemeris<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ufa State Petroleum Technological University

<sup>b</sup>Institute of Biochemistry and Genetics –  
Subdivision of the Ufa Federal Research Centre RAS

<sup>c</sup>Institute of Petrochemistry and Catalysis RAS  
Ufa, Russian Federation

Received 16.12.2022, received in revised form 28.04.2023, accepted 09.07.2023

**Abstract.** Identification of natural donors of three bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **BAD** subgenomes is of great importance for developing technologies aimed at improving this crop. The question about the species and subspecies of the wheat–*Aegilops* alliance serving as donors of the **B** and **A** subgenomes remains unanswered, while the *Aegilops tauschii* subspecies of *strangulata* is considered as a donor of the **D** subgenome. To identify the donor species of subgenomes of polyploid forms, the comparison of the nucleotide sequences of various genes, as well as fragments of repetitive DNA, is performed to construct phylogenetic trees. In that case, however, only one or a few genetic systems or loci are taken into analysis. The genomic barcoding proposed by the authors, which is not tied to any genetic system, has an advantage, since *in silico* RAPD analysis «finds» fragments matching in size in the entire genome, making, as it were, a complete «slice» of it. To estimate the phylogenetic relationship of different wheat species, we used the method of virtual multiplex RAPD analysis with 20 undecamer primers, which made it possible to create genomic barcodes of these species and compile two-dimensional maps for individual chromosomes of the analyzed wheat species. The proposed method of computer analysis of genomes showed that *T. aestivum* subgenome **D** and *Ae. tauschii* are very similar to each other, which may indicate their common origin. No such definite conclusions could be drawn about the donors of

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: olga.kiryanova27@gmail.com

ORCID: 0000-0002-8563-1244 (Kuluev A.); 0000-0002-9848-2882 (Gubaydullin I.); 0000-0002-1564-164X (Kuluev B.); 0000-0002-8917-0449 (Chemeris A.)

subgenomes **A** and **B**, which is probably due to the more ancient association of these subgenomes in tetraploid wheat and the accumulation of a larger number of mutations over this time.

**Keywords:** *Triticum aestivum*, *Aegilops tauschii*, *Triticum urartu*, *Aegilops spletoides*, *in silico* RAPD analysis, computer simulation of PCR, genomic barcoding.

**Acknowledgements.** The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement no. 075–15–2021–1066, September 28, 2021) and State Assignment no. 122030200143–8.

Citation: Kiryanova O. Yu., Kuluev A. R., Gubaydullin I. M., Kuluev B. R., Chemeris A. V. Virtual *in silico* PCR in two-dimensional format as a tool for elucidating phylogenetic relationship in allopolyploid forms with wheats and their wild relatives *Aegilops* used as an example. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(1), 45–63. EDN: OIPJJV



## Виртуальная *in silico* ПЦР в двумерном формате как инструмент для выяснения филогенетического родства у аллополиплоидных форм на примере пшениц и их диких сородичей эгилопсов

О. Ю. Кирьянова<sup>а</sup>, А. Р. Кулуев<sup>б</sup>,

И. М. Губайдуллин<sup>а, в</sup>, Б. Р. Кулуев<sup>б</sup>, А. В. Чемерис<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Уфимский государственный нефтяной технический университет

<sup>б</sup>Институт биохимии и генетики –

обособленное структурное подразделение ФГБНУ

Уфимского федерального исследовательского центра РАН

<sup>в</sup>Институт нефтехимии и катализа –

обособленное структурное подразделение ФГБНУ

Уфимского федерального исследовательского центра РАН

Российская Федерация, Уфа

**Аннотация.** Определение природных доноров трех субгеномов **ВАД** мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) имеет большое значение в целях разработки технологий по дальнейшему совершенствованию данной культуры. До сегодняшнего дня остаются открытыми некоторые вопросы происхождения субгеномов **В** и **А** мягкой пшеницы, тогда как донором субгенома **Д** считается *Aegilops tauschii* подвид *strangulata*. Для установления видов-доноров субгеномов полиплоидных форм активно применяется сравнение нуклеотидных последовательностей различных генов, а также фрагментов повторяющейся ДНК, что позволяет строить филогенетические деревья. Однако в этом случае в анализ берется лишь одна или несколько генетических систем или локусов. Предложенное нами геномное штрихкодирование, не привязанное к какой-либо генетической системе, имеет преимущество, поскольку *in silico*

RAPD-анализ «находит» одинаковые по размеру участки сразу всего генома, делая как бы его полный «срез». Для оценки филогенетического родства разных видов пшеницы использовали метод виртуального мультиплексного RAPD-анализа с 20 ундекамерными праймерами, что позволило создать геномные штрихкоды этих видов, сопровождаемые двумерными картами, составленными для отдельных хромосом анализируемой пшеницы. Предложенный метод компьютерного анализа геномов показал, что *T. aestivum* субгеном **D** и *Ae. tauschii* весьма схожи между собой, что подтверждает их общее происхождение. В случае с донорами субгеномов **A** и **B** такие однозначные выводы сделать не удалось, что, возможно, связано с более древним объединением этих субгеномов в тетраплоидной пшенице и накоплением за это время большего количества мутаций.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, *Aegilops tauschii*, *Triticum urartu*, *Aegilops speltoides*, *in silico* RAPD-анализ, компьютерное моделирование ПЦР, геномное штрихкодирование.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Минобрнауки РФ (соглашение № 075–15–2021–1066 от 28 сентября 2021 г), а также в рамках государственного задания № 122030200143–8.

---

Цитирование: Кирьянова О. Ю. Виртуальная *in silico* ПЦР в двумерном формате как инструмент для выяснения филогенетического родства у аллополиплоидных форм на примере пшениц и их диких сородичей эгилопсов / О. Ю. Кирьянова, А. Р. Кулуев, И. М. Губайдуллин, Б. Р. Кулуев, А. В. Чемерис // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(1). С. 45–63. EDN: OIPJVV

---

## Введение

Основной хлебный злак – мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. представляет собой гексаплоидный вид с геномной формулой **BBAADD**, образовавшийся, как считается, всего около 10 тысяч лет назад. Однако какие именно виды пшениц и их ближайших сородичей – эгилопсов (*Aegilops* L.) послужили донорами трех субгеномов **B**, **A** и **D** до сих пор до конца неясно. Точно установленным считается, что последний субгеном **D** привнесен в некую тетраплоидную форму пшеницы эгилопсом *Aegilops tauschii* и, скорее всего, подвидом *strangulata*. При этом существует огромное количество экспериментальных и обзорных работ, в которых уделено внимание происхождению мягкой пшеницы и потенциальным донорам ее субгеномов (Мигушова, 1975; Goncharov, 2011; Haider, 2013 и др.). Нами тоже неоднократно уделялось внимание этим вопросам (Vakhitov et al., 2003;

Кулуев и др., 2016, 2020). Появившаяся возможность секвенировать полные геномы различных организмов привела к тому, что к настоящему времени таковые стали уже известны для многих видов организмов всех уровней генетической сложности. На сайтах <http://plants.ensembl.org/index.html> и <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/> в свободном доступе выложены полные геномы ряда видов пшенично-эгилопсного комплекса, включая саму гексаплоидную пшеницу *T. aestivum*, а также потенциальных доноров ее субгеномов, что позволяет проводить их всестороннее исследование.

С целью оценки филогенетического родства разных видов пшеницевых нами применен метод виртуального мультиплексного RAPD-анализа с 20 ундекамерными праймерами, что позволило создать геномные штрихкоды этих видов, сопроводив их двумерными картами, составленными для

отдельных хромосом анализируемых видов пшеницевых. Классический RAPD-анализ предполагает использование одного короткого обычно декамерного праймера, с помощью которого в ходе ПЦР образуется некоторое количество фрагментов ДНК, разделяемых гель-электрофорезом (Kuluev et al., 2018). При этом разделение в агарозном геле не обеспечивает определения размера ампликонов с точностью до нуклеотида, что очень важно для цифровизации данных, исключающих какие-либо неточности в виде  $\pm$  сколько-то нуклеотидов. Поэтому необходимо использовать секвенирующий гель-электрофорез в приборах капиллярного типа. Ранее нами был подробно описан принцип геномного штрихкодирования (Кириянова и др., 2020), и поэтому здесь на нем останавливаться не будем, заметив лишь, что рассматриваемый нами диапазон длин потенциальных ампликонов от 51 до 500 п.н. обеспечивает гигантское число комбинаций, делая этот метод пригодным и для ДНК-паспортизации сортов любых видов растений, но для его использования на практике необходим этап анализа *in silico* на предмет подбора оптимального количества праймеров с конкретными нуклеотидными последовательностями. Возвращаясь к проблеме установления видов-доноров субгеномов полиплоидных форм пшениц, необходимо отметить, что с этой целью активно применяется сравнение нуклеотидных последовательностей различных генов, а также фрагментов повторяющейся ДНК, что позволяет строить филогенетические древа. Однако в этом случае в анализ берется лишь одна или несколько генетических систем или локусов, которые могут эволюционировать по своим законам, не отражающим в полной мере реальную взаимосвязь исследуемых видов растений. Подход с геномным штрихкодированием,

не привязанный к какой-либо генетической системе или локусу, имеет в этом плане преимущество, поскольку *in silico* RAPD-анализ «находит» одинаковые по размеру участки сразу всего генома, делая как бы его полный «срез». При этом следующий этап в виде их двумерного *in silico* RAPD-анализа, примененного в данной работе, позволяет видеть не просто совпадение по размеру случайных фрагментов ДНК, но показывает их локализацию в хромосомах и позволяет принимать решение без установления (также *in silico*) их нуклеотидных последовательностей, что, впрочем, принципиально возможно, и нами ранее для контроля осуществлялось (Кириянова и др., 2020).

### Материалы и методы

Праймеры были сгенерированы с помощью разработанной нами программы генератора нуклеотидных последовательностей GATCGGenerator (Кириянова и др., 2021). Общей особенностью этих праймеров является GC-состав, составляющий около 45 %, что делает их относительно AT-богатыми (55 %), что важно для растительных организмов и приблизительно совпадает с таковым для геномов пшеницевых. Также для исключения образования гетеродимеров в ходе реальной («мокрой») амплификации эти праймеры большей частью несут в себе лишь три нуклеотида из четырех возможных (Гарафутдинов и др., 2019).

Из всего множества сгенерированных праймеров вручную были отобраны 6 наборов тестовых праймеров: два набора из 6 праймеров, три набора из 12 праймеров. Было проведено *in silico* исследование нескольких наборов праймеров, в результате которого были отобраны праймеры, которые дают достаточное количество полос и в комплексе позволяют зрительно анализировать разницу

между геномами. Были исключены праймеры, у которых не было обнаружено мест отжига. В результате был сформирован итоговый набор из 20 праймеров, представленный в данной статье.

Для проведения этой работы нами были подобраны 20 ундекамерных праймеров со следующими последовательностями (5'→3') – AACCGACAGA, AAGGGACAACA, AACCGAACACA, AACGCACAAGA, AAAACGCCAGA, AACGCCAAAGA, GCCACACACGA, AGCCACACCCA, AGCACTGACGA, CGACCACACGA, AGCCACCACCA, AGCACCAGCCA, GACAGCTTGGG, GACAGCACTCA, GCACCAACTGA, GGACAACGTCA, CGCAAGAACCA, AGCAGCAGTCA, ACGGACAAGCA, GACCACGAACA.

Для геномного штрихкодирования были взяты выложенные похромосомно геномы мягкой пшеницы, диплоидной пшеницы *T. urartu*, эгилопсов *Ae. spletoides*, *Ae. tauschii*. У всех стандартный набор хромосом  $x = 7$ . Выбор данных видов пшеницевых объясняется тем, что они являются наиболее вероятными донорами генома **VAD** мягкой пшеницы (Levy, Feldman, 2022). Кроме того, были проанализированы другие виды эгилопсов, также рассматривавшихся в качестве вероятных доноров субгенома **B**: *Ae. longissima*, *Ae. bicornis*, *Ae. searsii*, *Ae. sharonensis*.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей и определение их процента идентичности проводили при помощи программы MegAlign пакета Lasergene (DNASar, США) с использованием метода ClustalW. Все программные модули реализованы с помощью языка программирования Python 3.6 (<https://www.python.org/downloads/release/python-360/>). Карты сравнения геномов разработаны с помощью графической библиотеки Plotly (<https://plotly.com/python/>).

## Результаты и обсуждение

Компьютерный анализ пшеничных и эгилопсных геномов и подбор праймеров *in silico* проводили с помощью разработанных нами ранее программ BARCODE DNA ANALYZER (BDANALYZER) (Кириянова и др., 2022) и ABCDNA\_GS (Amplified Bar-Coded DNA Genome/Specimen), совмещенных с собственной базой данных (Кириянова и др., 2020a). Сначала проводился поиск возможных мест отжига праймеров, которые образуют ампликоны размером от 51 до 500 п.н. в программе BDANALYZER. То есть для заданных праймеров были найдены места отжига и отобраны лишь те пары, расстояние между которыми находится в диапазоне от 51 до 500 п.н. Результаты такого поиска представляются в виде таблицы в формате CSV, которая позволяет наглядно определить, какие праймеры при проведении ПЦР могут давать потенциально наибольший вклад в выявляемый полиморфизм ДНК, а какие дают низкий или нулевой результат. На данном этапе важно выбрать оптимальный набор праймеров, который бы дал достаточное количество ампликонов определенной длины и, соответственно, полос при штрихкодировании, позволил бы наглядно сравнивать между собой штрихкоды. Пример вывода результатов такого поиска представлен в табл. 1.

Далее были построены генетические штрихкоды и проведено сравнение расположения найденных ампликонов внутри каждой хромосомы для двух геномов. Сравнивались следующие пары геномов: *T. aestivum* субгеном **B** и *Ae. spletoides*, *T. aestivum* субгеном **A** и *T. urartu*, *T. aestivum* субгеном **D** и *Ae. tauschii*. Такое попарное сравнение связано с тем, что предполагаемыми донорами соответствующих субгеномов являются именно эти виды пшеницевых (Levy, Feldman, 2022). Предварительно для каждого генома/субгено-

Таблица 1. Пример результатов поиска мест отжига ампликонов для генома *T. aestivum*Table 1. An example of results of the search for amplicon annealing sites for the *T. aestivum* genome

file	forward primer	forward primer position	reverse primer	reverse primer position	amplicon size
Triticum_aestivum.IWGSC.dna.chromosome.6B.fa	CGCAGAACCA	12886800	TGACTGCTGCT	12886858	58
Triticum_aestivum.IWGSC.dna.chromosome.7A.fa	AACGCCAAGA	311963094	TGGTGGTGGCT	311963153	59
Triticum_aestivum.IWGSC.dna.chromosome.1A.fa	AACGAACACA	83371490	TGTGTTCGGTT	83371557	67
Triticum_aestivum.IWGSC.dna.chromosome.7B.fa	AACGAACACA	348521709	TGTGTTCGGTT	348521776	67
Triticum_aestivum.IWGSC.dna.chromosome.1A.fa	AACGAACACA	439841303	TGTGTTCGGTT	439841371	68
Triticum_aestivum.IWGSC.dna.chromosome.3B.fa	AACGAACACA	525126456	TGTGTTCGGTT	525126524	68
Triticum_aestivum.IWGSC.dna.chromosome.5A.fa	AACGAACACA	507492160	TGTGTTCGGTT	507492228	68

ма был подготовлен отдельный файл с входными данными на основе найденных мест отжига праймеров в формате \*.xlsx. Структура файла выглядит следующим образом: имя файла – название генома, каждый лист файла – информация об отдельной хромосоме. Лист именуется в виде порядкового номера хромосомы, или можно добавить букву, обозначающую субгеном. На каждом листе отображается информация в виде таблицы: Primer\_position – позиции отжига прямого праймера (для определения локализации ампликона в хромосоме), Amplicon – размер ампликона.

В результате такого сравнения получается карта распределения ампликонов внутри хромосомы, на которой черным цветом обозначены совпадающие по размеру ампликоны, белым (прозрачный круг) и серым цветом – ампликоны, характерные только для одного из сравниваемых геномов. Пример такого сравнения показан на рис. 1.

Принцип разработанного нами подхода *in silico* анализа представлен на рис. 2. Здесь

наглядно показана последовательность действий, а также данные, которые получены в результате каждого шага.

После проведенного двумерного сравнения были определены ампликоны, совпадающие по размеру и наиболее близко расположенные друг к другу у сравниваемых геномов с учетом их коллинеарности (на рис. 1 они изображены как близко расположенные черные круги). Для этих ампликонов был проведен сравнительный анализ на уровне нуклеотидов с целью определения их гомологичности. То есть для примера, показанного на рис. 1, проводилось бы сравнение нуклеотидного состава ампликонов, изображенное на рис. 3.

Зная начальную и конечную позиции расположения прямого и обратного праймеров, можно найти непосредственно данный участок в FASTA-файле. Проведенное сравнение показало значительное сходство по нуклеотидному составу ампликонов при совпадении их размеров (табл. 2, 3, 4).

Проведенный *in silico* RAPD-анализ в виде виртуальной мультиплексной ПЦР

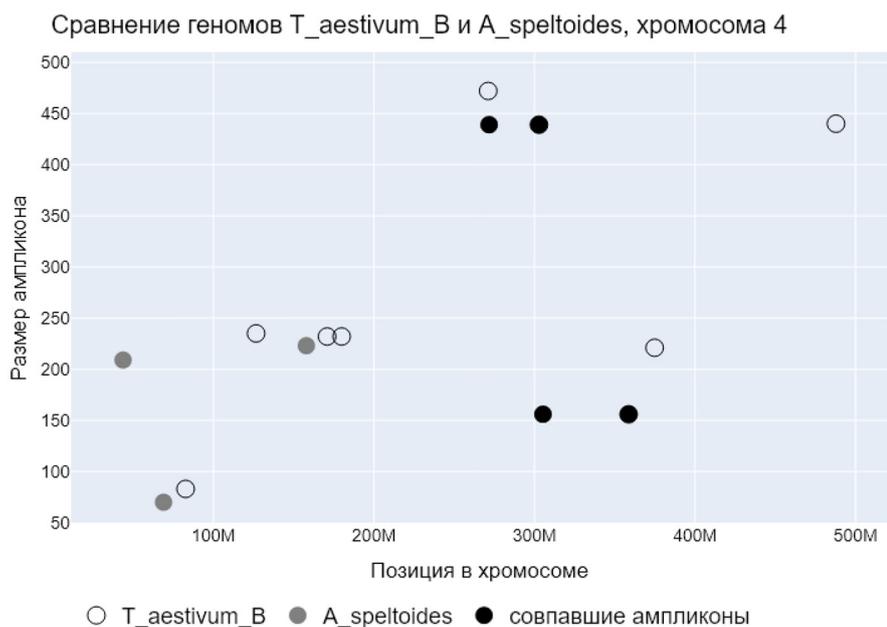


Рис. 1. Пример похромосомного двумерного анализа распределения ампликонов у мягкой пшеницы и видов – потенциальных доноров ее субгеномов (4 – номер гомеологичной хромосомы). Белый (прозрачный) круг – ампликоны *T. aestivum*; серый – ампликоны *Ae. speltoides*; черный – ампликоны *T. aestivum* и *Ae. speltoides*, совпавшие по размеру

Fig. 1. An example of chromosomal two-dimensional analysis of amplicon distribution in bread wheat and species that are potential donors of its subgenomes (4 is the number of homeologous chromosome). White (clear), *T. aestivum* amplicons; grey, *Ae. speltoides* amplicons; black – amplicons of *T. aestivum* and *Ae. speltoides* matching in size



Рис. 2. Принцип предложенного *in silico* анализа геномов и последовательность обработки данных

Fig. 2. The principle of the proposed *in silico* analysis of genomes and steps of data processing

с подобранными нами 20 праймерами позволил обнаружить в выбранном диапазоне размеров от 51 до 500 п.н. около 40–50 ампликонов для субгеномов **B**, **A** и **D** мягкой пшеницы и видов – потенциальных доноров этих субгеномов. Как можно видеть на рис. 4 и 5, ряд ампликонов у этих видов и субгеномов со-

впадают или очень близки по размеру, из чего можно предполагать, что это одинаковые или гомологичные участки их геномов. Как видно на рис. 4, геномные штрихкоды *T. aestivum* субгеном **D** и *Ae. tauschii* весьма схожи между собой, что еще раз подтверждает их общее происхождение. Стоит отметить, что при

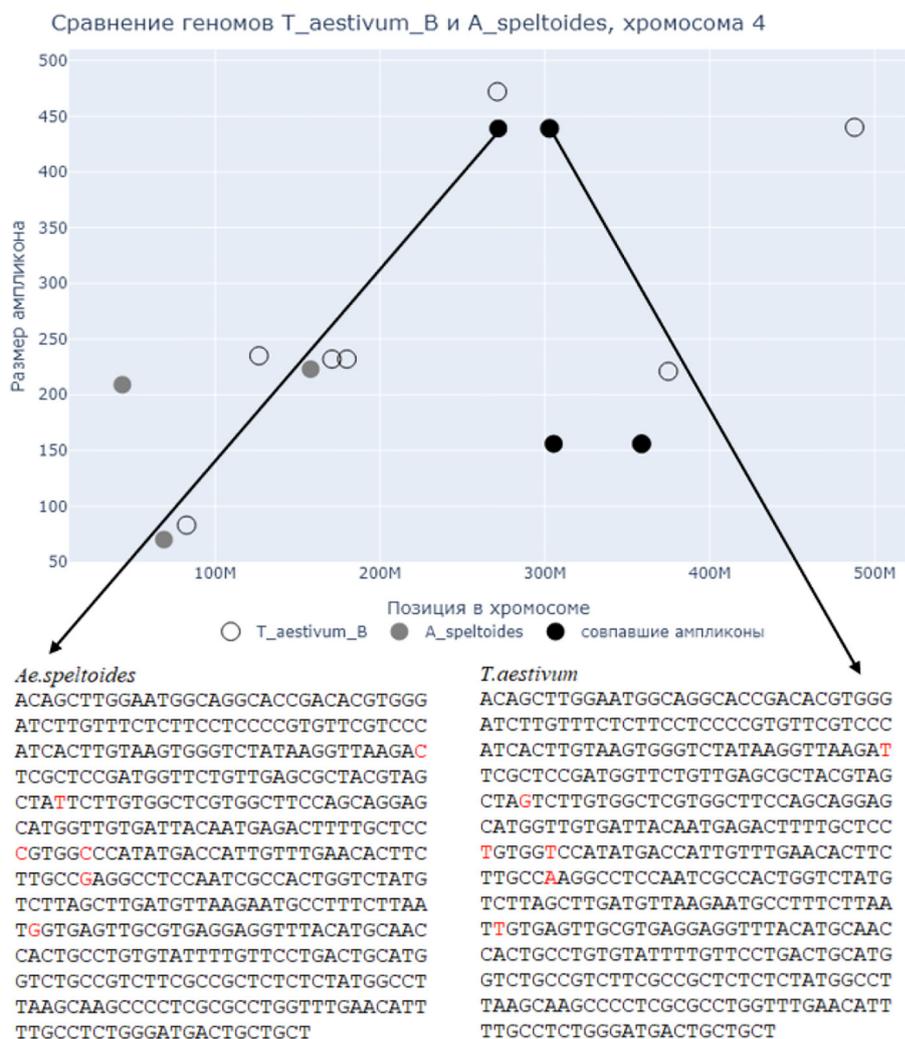


Рис. 3. Принцип выбора ампликонов для сравнения по нуклеотидным последовательностям. Справа показана нуклеотидная последовательность ампликона *T. aestivum*, а слева – *Ae. speltoides*. Из рисунка видно, что выделенные ампликоны содержат гомологичные нуклеотидные последовательности. Красным отмечены отличающиеся нуклеотиды. Данные последовательности сходны друг с другом на 98,6 %, что позволяет считать их родственными

Fig. 3. The principle of selection of amplicons for comparison by nucleotide sequences. The nucleotide amplicon sequence of the *T. aestivum* is shown on the right, and *Ae. speltoides* is shown on the left. The marked amplicons contain homologous nucleotide sequences. The different nucleotides are marked in red. These sequences are 98.6 % homologous to each other, which allows us to consider them related

Таблица 2. Сравнение совпадающих и близких по размеру ( $\pm 3$  п.н.) ампликонов по нуклеотидному составу для субгенома **B** *T. aestivum* и *Ae. speltooides*Table 2. Comparison of identical and similar size ( $\pm 3$  bp) amplicons by nucleotide composition of *T. aestivum* subgenome **B** and *Ae. speltooides*

<i>T. aestivum</i> субгеном <b>B</b>			<i>Ae. speltooides</i>			Процент идентичности нуклеотидов (%)
Позиция прямого праймера	Позиция обратного праймера	Размер ампликона	Позиция прямого праймера	Позиция обратного праймера	Размер ампликона	
Хромосома 1						
439696211	439696440	229	414389062	414389291	229	70,5
Хромосома 2						
552164185	552164340	155	543878527	543878683	156	17,9
530456167	530456323	156	543878527	543878683	156	88,5
Хромосома 3						
138390601	138391090	489	86776651	86777140	489	94,1
Хромосома 4						
302854627	302855066	439	271785545	271785984	439	98,7
Хромосома 5						
63192550	63192733	183	43441847	43442030	183	99,5
Хромосома 6						
20465358	20465514	156	365979068	365979224	156	17,8
Хромосома 7						
263552300	263552456	156	212440595	212440751	156	90,4

формировании штрихкодов не учитывается кратность возникновения ампликонов одной длины, нас интересует только наличие того или иного ампликона. При визуальной оценке между *T. aestivum* субгеном **A** и *T. urartu* различий в штрихкодах выявляется уже гораздо больше (рис. 4). В случае сравнения субгенома **B** и генома *Ae. speltooides* совпадений было выявлено еще меньше. По результатам визуального сравнения штрихкодов субгенома **B** с геномами эгилопсов из секции *Sitopsis* видно, что с этим субгеномом одинаково схожи геномы не только *Ae. speltooides*, но и *Ae. bicornis*, *Ae. longissima* (рис. 5).

С учетом возможных делеций и инсерций можно предположить, что и несколько отличающиеся по размеру ампликоны, локализующиеся в сходных участках хромосом, могут принадлежать одинаковым или гомоло-

гичным участкам. Для подтверждения такой возможности нами проведен анализ образующихся ампликонов по размеру с учетом их локализации в конкретных хромосомах (рис. 6). В этом случае рассматривается распределение абсолютно всех ампликонов в хромосомах. Поэтому количество полос на штрихкоде и ампликонов на двумерных картах значительно отличается. При этом разным цветом обозначены ампликоны, свойственные или только субгеномам мягкой пшеницы (белый цвет), либо только видам – потенциальным донорам этих самых субгеномов (серый цвет). Черным цветом отображены ампликоны, совпадающие по размеру у мягкой пшеницы и видов – потенциальных доноров. При таком сопоставлении виртуальных ампликонов их точная локализация на хромосомах не столь принципиальна, как было важно показать об-

Таблица 3. Сравнение совпадающих и близких по размеру ( $\pm 3$  п.н.) ампликонов по нуклеотидному составу для *T. aestivum* субгеном **A** и *T. urartu*Table 3. Comparison of identical and similar size ( $\pm 3$  bp) amplicons by nucleotide composition of *T. aestivum* subgenome **A** and *T. urartu*

<i>T. aestivum</i> субгеном <b>A</b>			<i>T. urartu</i>			Процент идентичности нуклеотидов (%)
Позиция прямого праймера	Позиция обратного праймера	Размер ампликона	Позиция прямого праймера	Позиция обратного праймера	Размер ампликона	
Хромосома 1						
83371490	83371557	67	95698487	95698554	67	100,0
439841303	439841371	68	440421903	440421971	68	100,0
439841303	439841371	68	440544506	440544574	68	100,0
494393892	494393963	71	490397728	490397799	71	100,0
Хромосома 2						
690910226	690910494	268	668800931	668801199	268	24,6
104671882	104672276	394	102352938	102353332	394	21,3
Хромосома 3						
519837733	519837880	147	521569961	521570108	147	96,6
Хромосома 4						
637114870	637115103	233	592870802	592871035	233	99,1
637114870	637115103	233	593219307	593219540	233	28,9
606921462	606921893	431	616666113	616666547	434	97,2
Хромосома 5						
384193781	384194005	224	371278975	371279199	224	100,0
445688045	445688409	364	422626585	422626950	365	94,8
Хромосома 6						
564509766	564509948	182	523401534	523401716	182	45,5
Хромосома 7						
442562219	442562451	232	435699634	435699866	232	39,6
551937862	551938289	427	547384499	547384925	426	96,7

ший вид распределения найденных ампликонов по всем субгеномам сразу.

В колонке «Субгеном **B**» проводилось похромосомное сравнение субгенома **B** мягкой пшеницы с *Ae. speltoides*, в колонке «Субгеном **A**» с *T. urartu* и в колонке «Субгеном **D**» с *Ae. tauschii*. Проведенный анализ, представленный на рис. 6, наглядно показывает, что для субгенома **D** и *Ae. tauschii* намного больше совпадающих ампликонов (129 по всем 7 хромосомам) и по размеру, и по их локализации в хромосомах, чем в случае сравнения субгеномов **A** и **B** с геномами соответствующих

эгилопсов. Сопоставление этого результата с подобными сравнениями субгеномов **B** и **A** с *Ae. speltoides* и *T. urartu*, демонстрирующих всего 37 и 36 совпадений соответственно, фактически подтверждает, что *Ae. tauschii* действительно был донором субгенома **D** мягкой пшеницы, тогда как *Ae. speltoides* и *T. urartu* могут претендовать на виды, близкие к тем, что послужили донорами двух других субгеномов *T. aestivum*. Некая тетраплоидная пшеница с субгеномами **B** и **A** образовалась значительно раньше, нежели мягкая гексаплоидная пшеница, что все же позволяет

Таблица 4. Сравнение совпадающих и близких по размеру ( $\pm 3$  п.н.) ампликонов по нуклеотидному составу для *T. aestivum* субгеном **D** и *Ae. tauschii*Table 4. Comparison of identical and similar size ( $\pm 3$  bp) amplicons by nucleotide composition of *T. aestivum* subgenome **D** and *Ae. tauschii*

<i>T. aestivum</i> субгеном <b>D</b>			<i>Ae. tauschii</i>			Процент идентичности нуклеотидов (%)
Позиция прямого праймера	Позиция обратного праймера	Размер ампликона	Позиция прямого праймера	Позиция обратного праймера	Размер ампликона	
Хромосома 1						
28872846	28873002	156	31342752	31342908	156	99,4
180301560	180301743	183	185649300	185649483	183	100,0
147104843	147105063	220	13610302	13610522	220	22,7
389120439	389120669	231	395539776	395540007	231	98,7
389747420	389747652	232	396094528	396094760	232	98,3
91569625	91569960	335	99752760	99753095	335	23,5
Хромосома 2						
380695918	380696062	144	379585379	379585523	144	100,0
327072075	327072287	212	325829056	325829268	212	100,0
342955210	342955441	231	341638015	341638246	231	100,0
20901974	20902206	232	22026349	22026581	232	100,0
296091638	296091870	232	294766590	294766822	232	100,0
346136110	346136342	232	344883552	344883784	232	99,1
349837392	349837624	232	348569370	348569602	232	99,6
346136110	346136342	232	348569370	348569602	232	93,1
349837392	349837624	232	344883552	344883784	232	94,4
510138042	510138274	232	508718054	508718286	232	100,0
584913162	584913394	232	583261185	583261417	232	98,7
465701901	465702133	232	465009093	465009325	232	100,0
465803101	465803333	232	465111081	465111313	232	100,0
548259100	548259368	268	546854889	546855157	268	99,6
442329630	442330034	404	441590658	441591062	404	99,5
Хромосома 3						
140869549	140869705	156	143215628	143215784	156	100,0
140823781	140823937	156	143170549	143170705	156	100,0
525401120	525401276	156	533932724	533932880	156	100,0
352801079	352801236	157	360184183	360184340	157	100,0
578168470	578168664	194	589015637	589015831	194	99,0
256153049	256153269	220	263700036	263700256	220	100,0
140869474	140869705	231	143215553	143215784	231	100,0
26549091	26549323	232	28749846	28750078	232	99,1
250172412	250172644	232	257598492	257598724	232	100
273916425	273916657	232	281410195	281410427	232	99,6
549679937	549680169	232	558167041	558167273	232	99,1
526997967	526998258	291	535619808	535620099	291	99,7

Продолжение табл. 4

Table 4 Continued

<i>T. aestivum</i> субгеном <b>D</b>			<i>Ae. tauschii</i>			Процент идентичности нуклеотидов (%)
Позиция прямого праймера	Позиция обратного праймера	Размер ампликона	Позиция прямого праймера	Позиция обратного праймера	Размер ампликона	
285403802	285404242	440	292808722	292809162	440	99,5
Хромосома 4						
50009663	50009895	232	510018903	510019135	232	95,7
467557710	467557942	232	474225579	474225811	232	100,0
316999056	316999380	324	324545177	324545501	324	99,7
287554825	287555264	439	295090899	295091338	439	37,7
Хромосома 5						
342823059	342823215	156	350115450	350115606	156	100,0
300404853	300405084	231	307559257	307559488	231	99,6
33889733	33889965	232	36863145	36863377	232	99,6
281995744	281995976	232	289013408	289013640	232	99,6
537196318	537196550	232	549313870	549314102	232	100,0
300383556	300383788	232	307536829	307537061	232	100,0
262784322	262784730	408	269614209	269614617	408	99,5
Хромосома 6						
272111805	272112017	212	295735082	295735294	212	99,5
311661592	311661824	232	334717146	334717378	232	100,0
345211682	345211914	232	330655041	330655273	232	84,9
455146365	455146597	232	478193687	478193919	232	99,6
451684258	451684559	301	474150212	474150513	301	100,0
Хромосома 7						
308814473	308814701	228	314125286	314125514	228	100,0
595288430	595288661	231	601089913	601090144	231	100,0
51903609	51903841	232	50348563	50348795	232	99,6
323860155	323860387	232	328641564	328641796	232	99,5
411275737	411275969	232	410899236	410899468	232	99,6
467280096	467280328	232	467546667	467546899	232	100,0
619703348	619703580	232	624135569	624135801	232	100,0
293419829	293420298	469	295635832	295636301	469	99,1

думать о произошедших за долгие годы эволюции гораздо больших изменениях данных субгеномов в составе сначала тетраплоидного, а затем и гексаплоидного видов пшениц. Также представляет определенный интерес совпадение числа ампликонов в формате 2d для субгенома **B** мягкой пшеницы и эгилоп-

сов секции *Sitopsis* (табл. 5), из которого видно, что представители подсекции *Emarginata* гораздо сильнее удалены от некоего (может неизвестного) донора субгенома **B**, поскольку в этом случае выявлялось от 20 до 24 общих ампликонов. По результатам похромосомного двумерного анализа распределения амплико-

<i>Triticum aestivum</i> субгеном <b>A</b>	059067 068071 093121 147151 173182 183224 229231 232233 234247 268270 293323 357363 364382 383394 407416 426427 431443 494	
<i>T. urartu</i>	067068 071093 121147 156182 183219 220223 224230 232233 252255 268272 290301 357358 362363 364365 381383 394411 416426 427428 429434 443	
<i>T. aestivum</i> субгеном <b>B</b>	058067 068083 090093 116122 123131 144150 155156 157159 178182 183193 196210 221229 231232 235239 278310 325333 374386 387390 398402 423424 433439 440448 472477 489498	
<i>Aegilops speltoides</i>	058066 070093 144155 156157 158173 183196 197209 223229 232305 320368 385390 439446 460468 489	
<i>T. aestivum</i> субгеном <b>D</b>	104144 156157 183194 212220 223228 229230 231232 238268 285291 301305 309324 335339 352366 390404 408428 439440 448469	
<i>Ae. tauschii</i>	104111 144156 157182 183194 212220 228229 231232 233238 245268 280285 291300 301307 309324 335339 390404 408439 440442 443444 469	

Рис. 4. Геномные штрихкоды ряда видов пшенично-эгилопного комплекса, полученные в результате моделирования мультиплексной ПЦР с 20 праймерами. Во втором столбце приведены размеры потенциальных ампликонов в п.н.

Fig. 4. Genomic barcodes of several species of the wheat-*Aegilops* alliance obtained by modeling multiplex PCR with 20 primers. The second column shows the sizes of potential amplicons in bp.

<i>T. aestivum</i> субгеном <b>B</b>	058 067 068 083 090 093 116 122 123 131 144 150 155 156 157 159 178 182 183 193 196 210 221 229 231 232 235 239 278 310 325 333 374 386 387 390 398 402 423 424 433 439 440 448 472 477 489 498	
<i>Ae. speltooides</i>	058 066 070 093 144 155 156 157 158 173 183 196 197 209 223 229 232 305 320 368 385 390 439 446 460 468 489	
<i>Ae. bicornis</i>	058 067 068 079 092 094 095 113 137 140 155 156 157 169 171 172 175 183 189 190 213 219 223 224 227 228 229 231 232 233 243 252 258 285 288 289 301 325 331 333 335 336 337 339 347 350 353 355 356 358 363 364 368 389 390 391 401 415 419 435 439 449 450 468 469	
<i>Ae. longissima</i>	056 067 068 093 111 125 144 153 155 156 157 158 172 183 189 198 210 217 219 220 223 225 229 231 232 240 243 244 257 277 286 301 318 326 333 337 339 364 368 374 398 413 439 449 482 485	
<i>Ae. searsii</i>	095 102 125 149 156 157 167 168 172 174 183 202 208 213 218 223 226 228 229 230 231 232 235 240 241 267 325 333 339 346 350 353 356 357 385 386 387 406 408 409 414 421 431 440 449 453 454 462	
<i>Ae. sharonensis</i>	067 068 093 120 125 137 145 153 155 156 157 172 173 183 190 212 217 218 219 223 225 229 231 232 233 258 286 288 301 329 332 333 337 338 339 342 364 364 374 411 413 415 439 449 456 485	

Рис. 5. Геномные штрихкоды субгенома **B** *T. aestivum* и видов рода *Aegilops* секции *Sitopsis*, полученные в результате моделирования мультиплексной ПЦР с 20 праймерами. Во втором столбце приведены размеры потенциальных ампликонов в п.н.

Fig. 5. Genomic barcodes of *T. aestivum* subgenome **B** and *Aegilops* species of the *Sitopsis* section obtained by modeling multiplex PCR with 20 primers. The second column shows the sizes of potential amplicons in bp.

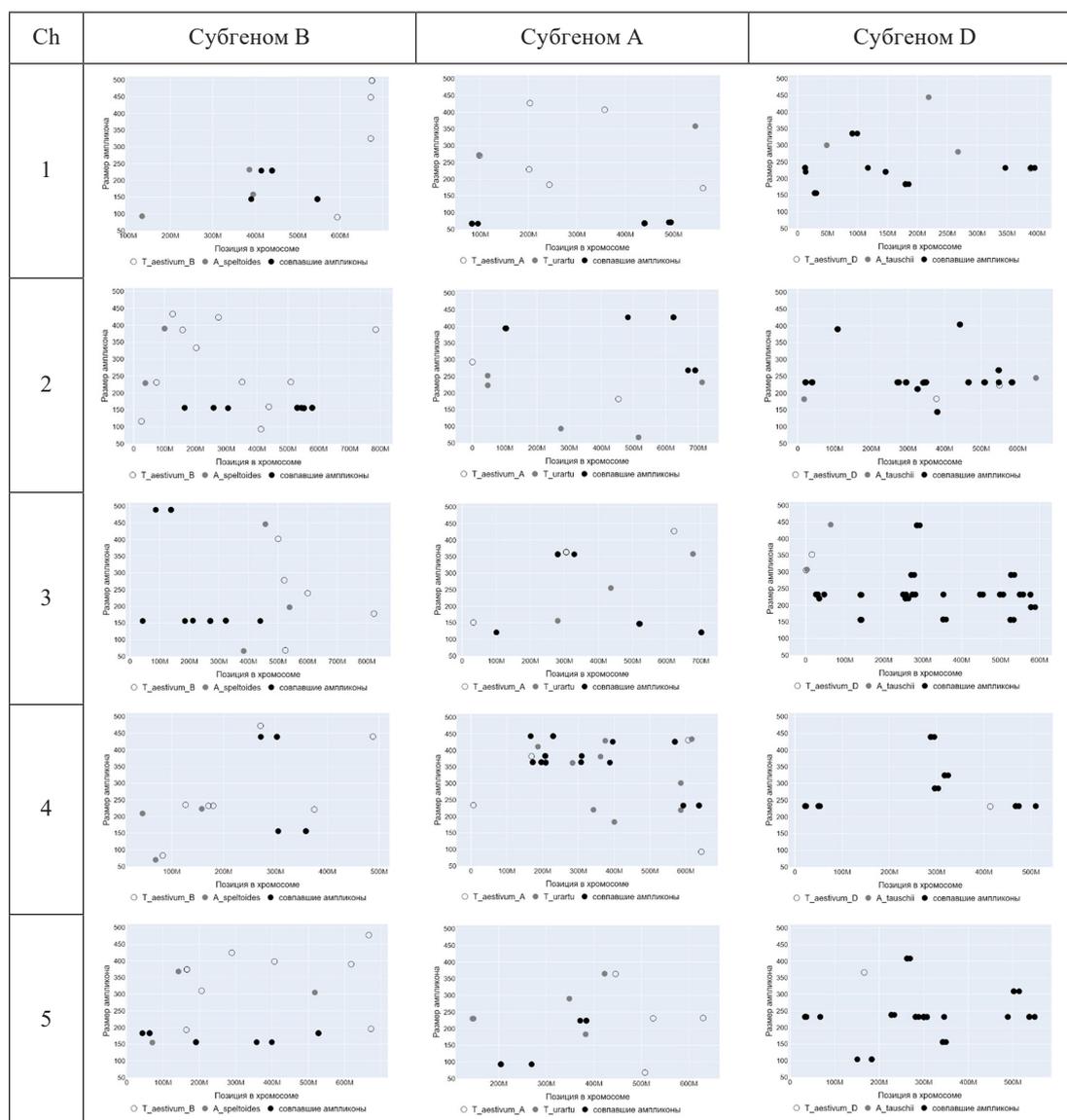
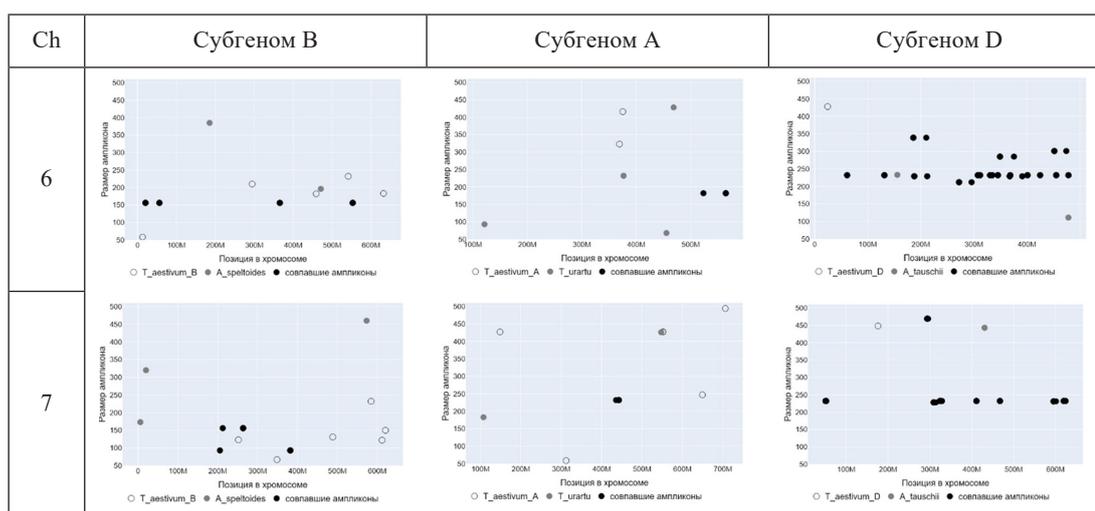


Рис. 6. Похромосомный двумерный анализ распределения ампликонов у мягкой пшеницы и видов *Ae. speltoides*, *T. urartu*, *Ae. tauschii* – потенциальных доноров ее субгеномов (1–7 – номера гомеологических хромосом). Во втором столбце приведены результаты сравнения субгенома В мягкой пшеницы с геномом *Ae. speltoides*. В третьем столбце приведены результаты сравнения субгенома А мягкой пшеницы с геномом *T. urartu*. В четвертом столбце приведены результаты сравнения субгенома D мягкой пшеницы с геномом *Ae. tauschii*

Fig. 6. Chromosomal two-dimensional analysis of amplicon distribution in bread wheat and species *Ae. speltoides*, *T. urartu*, *Ae. tauschii* – potential donors of its subgenomes (1–7 are the numbers of homeologous chromosomes). The second column shows the results of comparison of the B subgenome of bread wheat with the *Ae. speltoides* genome. The third column shows the results of comparison of the A subgenome of bread wheat with the *T. urartu* genome. The fourth column shows the results of comparison of the D subgenome of bread wheat with the *Ae. tauschii* genome



Продолжение рис. 6

Fig. 6 Continued

нов у субгенома **В** мягкой пшеницы и видов эгилопсов секции *Sitopsis* (табл. 5) можно видеть, что к данному субгеному более близок геном *Ae. speltoides*. На примерно таком же уровне схожести находятся субгеном **А** и геном *T. urartu*.

Нельзя было исключать того, что совпадающие по размеру ампликоны содержат не гомологичные нуклеотидные последовательности. С другой стороны, близкие по размеру ампликоны могли содержать родственные последовательности. Исходя из этого, нами было проведено выравнивание и сравнение совпадающих и наиболее близких по размеру ( $\pm 3$  п.н.) нуклеотидных последовательностей, расположенных относительно близко друг от друга в рамках хромосомы. Из сравнения были исключены ампликоны, совпадающие по размеру, но локализованные в разных участках хромосомы, так как велика вероятность, что это разные нуклеотидные фрагменты. Действительно, к примеру, в случае с *T. aestivum* субгеном **В** и *Ae. speltoides* два совпадающих по размеру ампликона содержали не гомологичные нуклеотидные последовательности (табл. 2). В случае с *T. aestivum* субгеном **А** и *T. urartu* 5 ампликонов оказались не гомологичными (табл. 3). В то же время при сравнении субгенома **Д** с геномом *Ae. tauschii* выявлялось большое количество схожих ампликонов, для части из них было характерно 100 %-ное совпадение (табл. 4).

Из табл. 2–4 видно, что в большинстве случаев ампликоны одинакового размера, локализованные в одной области хромосомы, характеризуются очень схожим нуклеотидным составом, за исключением определенного количества нуклеотидных замен, что может говорить о родственности геномов, по крайней мере, при идентичности больше 50 %.

Таким образом, разработанный нами компьютерный метод анализа родственных геномов позволяет достаточно быстро провести сравнение геномов и даже спланировать натуральный эксперимент, подобрав оптимальный набор праймеров, а также дать общее представление того, какой результат может быть получен в ходе проведения ПЦР в «мокрых» экспериментах. Однако необходимо от-

— 60 —

Таблица 5. Число совпадающих по размеру ампликонов при сравнении субгеномов *T. aestivum* с представителями пшенично-эгилопсного комплексаTable 5. The number of amplicons with the same length as the result of comparison of the subgenomes of *T. aestivum* with the wheat-aegilops complex

Сравнение с субгеномом В								
Виды	Хромосомы							
	1	2	3	4	5	6	7	Σ
<i>Ae. speltoides</i>	4	7	8	4	6	4	4	37
<i>Ae. bicornis</i>	2	5	4	5	3	2	3	24
<i>Ae. longissima</i>	4	5	3	5	2	0	2	22
<i>Ae. searsii</i>	0	9	4	3	0	3	2	21
<i>Ae. sharonensis</i>	2	5	2	6	2	0	3	20
Сравнение с субгеномом А								
<i>T. urartu</i>	5	5	5	13	4	2	2	36
Сравнение с субгеномом D								
<i>Ae. tauschii</i>	13	16	32	11	21	24	12	129

метить, что для натуральных экспериментов необходимо более тщательно подойти к подбору набора праймеров. К тому же едва ли можно рассчитывать на то, что удастся наработать все теоретически предсказанные ампликоны, но при использовании автоматических капиллярных секвенаторов, по крайней мере, будут выявляться большинство амплифицированных фрагментов ДНК. Метод построения двумерных карт для исследуемых геномов проведен впервые и позволяет наглядно выявить потенциально схожие фрагменты ДНК, не прибегая к методу выравнивания нуклеотидных последовательностей геномов. Кроме того, полагаясь на созданные карты, можно провести более глубокий нуклеотидный анализ ампликонов, незначительно различающихся по размеру, но расположенных близко друг от друга на предмет выявления частичных изменений нуклеотидных последовательностей.

Проведённый нами геномный *in silico* RAPD-анализ очередной раз подтвердил, что донором субгенома **D** мягкой пшеницы действительно является *Ae. tauschii*. Наши

результаты согласуются с данными о том, что мягкая пшеница *T. aestivum* возникла в результате гибридизации между культурной полбой *T. turgidum* ( $2n = 4x = 28$ , **AABB**) и *Ae. tauschii* ( $2n = 2x = 14$ , **DD**) (Конарев и др., 1974; Dudnikov, 2017). В случае с донорами субгеномов **A** и **B** такие однозначные выводы с помощью предложенного нами подхода сделать не удалось, что, возможно, связано с более древним объединением этих субгеномов в тетраплоидной пшенице и накоплением за это время большего количества мутаций.

### Заключение

Знание истинных доноров пшеничных субгеномов представляет далеко не праздный интерес, поскольку в пшенично-эгилопсном комплексе имеется по меньшей мере 12 диплоидных геномов, а Природа использовала при создании двух рядов полиплоидных пшениц (*aestivum-turgidum* и *timopheevii-zhukovskyi*) не более шести, при том что человечество сейчас «кормят» всего три субгенома. К тому же Природа при гибридизации могла выбирать лишь из видов, произрас-

тающих совместно и поэтому для селекционеров остается еще большой простор для проведения различных скрещиваний с целью создания новых синтетических видов пшениц, которые потенциально могут иметь увеличенную урожайность, лучшую устойчивость к вредителям и прочие важные качества. Но для ведения подобных работ нужно точно знать, что уже было использовано Природой. Предлагаемый подход к анализу полных ядерных геномов при помощи виртуального RAPD-анализа *in silico* был испытан

на пшенично-эгилопсном комплексе, и показано, что он может служить одним из методов поиска истинных доноров пшеничных субгеномов **В** и **А** для ряда *turgidum-aestivum* и субгеномов **G** и **A** для ряда *timopheevii-zhukovskiy* (когда их полные геномы будут секвенированы), что позволит вести селекцию в дальнейшем более осознанно. Разработанная технология может быть рекомендована к использованию и на других видах живых организмов, имеющих полиплоидное происхождение.

### Список литературы / References

- Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан. Х., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Зубов В.В., Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Матниязов Р.Т., Сахабутдинова А.Р., Никоноров Ю.М., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал. Х., Чемерис А.В. (2019) Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора. *Биомика*, 11(1): 23–70 [Garafutdinov R.R., Baymiev An. Kh., Maleev G.V., Alexeev Ya. I., Zubov V.V., Chemeris D.A., Kiryanova O. Yu., Gubaydullin I.M., Matniyazov R. T., Sakhabutdinova A.R., Nikonorov Yu. M., Kuluev B.R., Baymiev Al. Kh., Chemeris A.V. (2019) Diversity of PCR primers and principles of their design. *Biomics* [Biomika], 11(1): 23–70 (in Russian)]
- Кирьянова О.Ю., Кирьянов И.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В., Губайдуллин И.М. (2021) GATCGGENERATOR. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2021667097, 25.10.2021. Заявка № 2021666409 от 20.10.2021 [Kiryanova O. Yu., Kiryanov I.I., Garafutdinov R.R., Chemeris A.V., Gubaydullin I.M. (2021) GATCGGENERATOR. Certificate of registration of a computer program 2021667097, 25.10.2021. Application No. 2021666409 dated 20.10.2021 (in Russian)]
- Кирьянова О.Ю., Кирьянов И.И., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В., Гарафутдинов Р.Р., Губайдуллин И.М. (2020а) Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2020610703 ABCDNA\_GS (Amplified Bar-Coded DNA Genome/Specimen) от 17.01.2020 г. [Kiryanova O. Yu., Kiryanov I.I., Kuluyev B. R., Chemeris A. V., Garafutdinov R.R., Gubaydullin I.M. (2020a) Certificate of state registration of computer program no. 2020610703 ABCDNA\_GS (Amplified Bar-Coded DNA Genome/Specimen) dated 17.01.2020 (in Russian)]
- Кирьянова О.Ю., Кирьянов И.И., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В., Губайдуллин И.М. (2022) BARCODE DNA ANALYZER (BDANALYZER). Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2022663254, 13.07.2022 [Kiryanova O. Yu., Kiryanov I.I., Kuluyev B. R., Chemeris A. V., Gubaydullin I.M. (2022) Certificate of state registration of computer program no. 2022663254 BARCODE DNA ANALYZER (BDANALYZER) dated 13.07.2022 (in Russian)]
- Кирьянова О.Ю., Кулуев Б.Р., Кулуев А.Р., Марданшин И.С., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. (2020) Мультиплексный *in silico* RAPD-анализ ряда родственных растений с отличающимися размерами геномов и перспективы такого подхода для ДНК-паспортизации сортов сельскохозяйственных растений. *Биомика*, 12(2): 194–210 [Kiryanova O. Yu., Kuluev B. R., Kuluev A.R., Mardanshin I.S., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. (2020) Multiplex *in silico*

RAPD-analysis of several related plants with different genome sizes and prospects for this approach for DNA-cataloguing of agricultural plant varieties. *Biomics* [Biomika], 12(2): 194–210 (in Russian)]

Конарев В. Г., Хакимова А. Г., Гаврилюк И. П., Мигушова Э. Ф. (1974) Дифференциация генома D по данным электрофоретического и иммунохимического анализа глиадина *Aegilops squarrosa* L. (*Ae. tauschii* Coss.). *Сельскохозяйственная биология*, 9(3): 352–358 [Konarev V. G., Hakimova A. G., Gavrilyuk I. P., Migushova E. F. (1974) Differentiation of the D genome according to electrophoretic and immunochemical analysis of *Aegilops squarrosa* L. (*Ae. tauschii* Coss.) gliadin. *Agricultural Biology* [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya], 9(3): 352–358 (in Russian)]

Кулуев А. Р., Матниязов Р. Т., Чемерис Д. А., Чемерис А. В. (2016) Современные представления о родственных взаимоотношениях в пшенично-эгилопсном альянсе (с краткой исторической справкой). *Биомика*, 8(4): 297–310 [Kuluev A. R., Matniyazov R. T., Chemeris D. A., Chemeris A. V. (2016) Modern concepts about relationships in the wheat-aegilops alliance (with a brief historical note). *Biomics* [Biomika], 8(4): 297–310 (in Russian)]

Кулуев А. Р., Матниязов Р. Т., Чемерис Д. А., Юнусбаев У. Б., Кулуев Б. Р., Чемерис А. В. (2020) Филогенетические взаимоотношения в пшенично-эгилопсном альянсе через призму хлоропластного генома. *Биомика*, 12(4): 532–544 [Kuluev A. R., Matniyazov R. T., Chemeris D. A., Yunusbaev U. B., Kuluev B. R., Chemeris A. V. (2020) Phylogenetic relationships in the wheat-aegilops alliance through the prism of the chloroplast genome. *Biomics* [Biomika], 12(4): 532–544 (in Russian)]

Мигушова Э. Ф. (1975) К вопросу о происхождении геномов пшеницы. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*, 55(3): 3–26 [Migushova E. F. (1975) On the origin of wheat genomes. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding* [Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii], 55(3): 3–26 (in Russian)]

Dudnikov A. J. (2017) Polymorphism of *Got2* DNA sequences sheds light on *Aegilops tauschii* Coss. intraspecies divergence and origin of *Triticum aestivum* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64(7): 1623–1640

Goncharov N. P. (2011) Genus *Triticum* L. taxonomy: the present and the future. *Plant Systematics and Evolution*, 295: 1–11

Haider N. (2013) The origin of the B-genome of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Russian Journal of Genetics*, 49(3): 263–274

Kuluev B. R., Baymiev A. K., Gerashchenkov G. A., Chemeris D. A., Zubov V. V., Kuluev A. R., Baymiev A. K., Chemeris A. V. (2018) Random priming PCR strategies for identification of multilocus DNA polymorphism in eukaryotes. *Russian Journal of Genetics*, 54(5): 499–513

Levy A. A., Feldman M. (2022) Evolution and origin of bread wheat. *Plant Cell*, 34(7): 2549–2567

Vakhitov V. A., Chemeris A. V., Sabirzhanov B. E., Akhunov E. D., Kulikov A. M., Nikonorov Yu. M., Gimalov F. R., Bikbulatova S. M., Baymiev Al. Kh. (2003) The phylogeny of *Triticum* L. and *Aegilops* L. inferred from comparative analysis of nucleotide sequences in rDNA promoter regions. *Russian Journal of Genetics*, 39(1): 1–11

EDN: NZWNRK

УДК 579

## **Oil-Degrading Microorganisms of the Genus *Pseudomonas* with Resistance to Additional Pollutants and Phytostimulating Activity as Promising Agents of Environmental Biotechnology**

**Tatiana Yu. Korshunova\***,  
**Elena V. Kuzina, Milyausha G. Iskuzhina,**  
**Svetlana R. Mukhamatdyarova and Yuliyana Yu. Sharipova**  
*Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of RAS*  
*Ufa, Russian Federation*

Received 20.03.2023, received in revised form 03.11.2023, accepted 05.12.2023

**Abstract.** Bioremediation of oil contaminated agricultural soils is greatly hindered by the presence of additional pollutants such as herbicides. They can inhibit the activity of introduced bacterial decomposers. The aim of the study is to screen for herbicide-resistant oil-degrading microorganisms and to evaluate their ability to stimulate growth and development of phytomeliorant plants. Isolated and identified strains of hydrocarbon-oxidizing pseudomonads were found resistant to herbicides based on various active ingredients (2,4-D, imazethapyr, mixtures of imazamox and quizalofop-P-ethyl), as well as to heavy metals such as lead, nickel and zinc. All bacteria exhibited nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing activity and produced indolyl-3-acetic acid. They helped plants to overcome stress caused by the presence of pollutants. They contributed to an increase in the length of the roots and shoots of barley and clover in clean and oil-contaminated soil and had a positive effect on clover seedlings in the presence of a herbicide. The *P. frederiksbergensis* UOM 11 strain was found to have a significant ability to decompose oil; it also enhanced growth and development of plants. Therefore, it is recommended as the basis for microbial-plant complexes for cleaning and restoring soils. The other strains obtained in screening are also valuable from the perspective of environmental biotechnology: *P. alcaligenes* UOM 10 is an effective oil-destroyer; the other microorganisms are prospective growth stimulators for phytomeliorant plants. The results obtained can be used in the development of bioremediation methods for oil-contaminated agricultural soils.

---

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: korshunovaty@mail.ru

ORCID: 0000-0002-6186-0827 (Korshunova T.); 0000-0002-6905-0108 (Kuzina E.); 0000-0003-0196-9596 (Iskuzhina M.); 0000-0001-7641-7943 (Mukhamatdyarova S.); 0000-0002-1794-5137 (Sharipova Yu.)

**Keywords:** oil, herbicides, pseudomonas, PGP-properties, growth-stimulating activity, barley, clover.

**Acknowledgments.** This work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23–24–00130, <https://rscf.ru/en/project/23–24–00130/>

Citation: Korshunova T. Yu., Kuzina E. V., Iskuzhina M. G., Mukhamatdyarova S. R., Sharipova Yu. Yu. Oil-degrading microorganisms of the genus *Pseudomonas* with resistance to additional pollutants and phytostimulating activity as promising agents of environmental biotechnology. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(1), 64–81. EDN: NZWNRK



## **Микроорганизмы-нефтедеструкторы рода *Pseudomonas* с устойчивостью к дополнительным поллютантам и фитостимулирующей активностью как перспективные агенты экобиотехнологии**

**Т. Ю. Коршунова, Е. В. Кузина, М. Г. Искужина,  
С. Р. Мухаматдырова, Ю. Ю. Шарипова**  
*Уфимский институт биологии  
Уфимского федерального исследовательского центра РАН  
Российская Федерация, Уфа*

**Аннотация.** Биологическая очистка сельскохозяйственных почв от нефти сильно затруднена присутствием таких дополнительных поллютантов, как гербициды, которые могут ингибировать деятельность интродуцированных бактерий-деструкторов. Целью исследования был скрининг микроорганизмов, разлагающих нефть и устойчивых к гербицидам, изучение их свойств, а также оценка способности к стимуляции роста и развития растений-фитомелиорантов. Выделенные и идентифицированные штаммы углеводородокисляющих псевдомонад проявляли устойчивость к гербицидам на основе различных действующих веществ (2,4-D, имазетапира, смеси имазамокса и хизалофоп-П-этила), а также к тяжелым металлам (свинец, никель и цинк). Все бактерии обладали азотфиксирующей и фосфатмобилизирующей активностью и продуцировали индолил-3-уксусную кислоту. Они помогали растениям ячменя и клевера преодолевать стресс, вызванный присутствием поллютантов путем увеличения длины корней и побегов в чистой и нефтезагрязненной почве и положительно влияли на проростки клевера в почве с гербицидом. Штамм *P. frederiksbergensis* UOM 11 обладал значительной способностью к разложению нефти и был способен к усилению роста и развития растений, поэтому он рекомендуется в качестве основы микробно-растительных комплексов для очистки и восстановления почв. Остальные штаммы также имеют ценность с точки зрения экологической биотехнологии: *P. alcaligenes* UOM 10 как нефтедеструктор, а остальные микроорганизмы – как стимуляторы роста растений-мелиорантов. Полученные результаты можно использовать при разработке способов биоремедиации нефтезагрязненных сельскохозяйственных почв.

**Ключевые слова:** нефть, гербициды, псевдомонады, PGP-свойства, ростстимулирующая активность, ячмень, клевер.

**Благодарности.** Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда № 23–24–00130, <https://rscf.ru/en/project/23–24–00130/>

Цитирование: Коршунова Т. Ю. Микроорганизмы-нефтедеструкторы рода *Pseudomonas* с устойчивостью к дополнительным поллютантам и фитостимулирующей активностью как перспективные агенты экобиотехнологии / Т. Ю. Коршунова, Е. В. Кузина, М. Г. Искужина, С. Р. Мухаматдыева, Ю. Ю. Шарипова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(1). С. 64–81. EDN: NZWNRK

## Введение

Во всем мире значительные площади сельскохозяйственных угодий подвержены углеводородному загрязнению (Martínez et al., 2022). При этом в большинстве случаев эти почвы уже изначально были контаминированы различными химическими средствами защиты растений, среди которых самым многочисленным классом (48 % от мирового потребления пестицидов (Gupta, 2017)) являются гербициды, используемые для уничтожения сорной растительности. Как и нефтепродукты (Sui et al., 2021), они отрицательно воздействуют на почвенные микроорганизмы и ингибируют рост и физиологические функции растений (Mahapatra et al., 2019; Meena et al., 2020). Одновременно находясь в почве, поллютанты могут усиливать негативные эффекты друг друга, что значительно усложняет ее очистку и восстановление (Ye et al., 2017). Проведено много исследований влияния на почву и ее биоценоз нефти и гербицидов по отдельности и предложены разные подходы для их удаления (Sun et al., 2018; Michael-Igolima et al., 2022). Однако существуют лишь единичные публикации, посвященные разработке способов очистки нефтезагрязненных территорий в присутствии таких дополнительных токсикантов, как гербициды (Islas-García et al., 2015).

В последнее время при разработке биологических подходов к очистке почв особое

внимание уделяется штаммам бактерий, которые, с одной стороны, обладают устойчивостью и способностью к биодеградации поллютантов, с другой стороны – улучшают рост растений-фитомелиорантов (Ebadi et al., 2018). С этой точки зрения большой интерес представляют бактерии рода *Pseudomonas*. Они являются активными деструкторами благодаря наличию специфических ферментных систем и дополнительного генетического материала в виде плазмид биодеградации и продуцируют биосурфактанты, способствующие диспергированию и солюбилизации гидрофобных веществ, углеводов, в частности (Kahlon, 2016; Silva et al., 2019). *Pseudomonas* spp. могут положительно влиять на растения за счет синтеза фитогормонов, сидерофоров, увеличения доступности микроэлементов, подавления фитопатогенов, а также индуцировать устойчивость к абиотическому стрессу (Sharma, Pathak, 2014; Korshunova et al., 2021). Псевдомонады поддерживают достаточную численность на минимальных питательных средах, обладают высокой скоростью размножения и при их культивировании можно использовать дешевое сырье, например, отходы других производств (Weimer et al., 2020).

Цель работы – выделение новых штаммов углеводородокисляющих бактерий рода *Pseudomonas*, устойчивых к гербицидам и оценка их способности к стимуляции роста и разветвления растений-фитомелиорантов.

## Материалы и методы

Штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов выделяли с помощью метода накопительных культур (Нетрусов, 2005) из образцов нефтезагрязненных пахотных почв с территории Республики Башкортостан, на которых применялись различные гербициды. В колбы со 100 мл жидкой минеральной среды Раймонда (Raymond, 1961) вносили 1 % (масс.) нефти и 2 г почвы и инкубировали на орбитальном шейкере ES-20/60 (SIA BIOSAN, Латвия) при температуре 28 °С и 160 об./мин в течение 7 суток. Для выделения изолятов проводили высев из накопительных культур на питательный агар (ПА) (Нетрусов, 2005), после чего микроорганизмы культивировали 5 суток при 28 °С. Для дальнейших исследований отбирали изоляты, наиболее активно растущие на твердой и жидкой среде Раймонда с нефтью в качестве единственного источника углерода. Интенсивность роста в жидкой среде с нефтью (4 % масс.) оценивали по изменению состояния среды и сдвигу pH.

Идентификацию штаммов проводили МАЛДИ масс-спектрометрическим методом (МАЛДИ–ВП) на приборе Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Германия), оснащенный времяпролетным анализатором так, как описано (Korshunova et al., 2015). Для определения таксономической принадлежности штаммов использовали программу Biotyper 3.0 (Bruker Daltonik). Каждому изоляту присваивали численный рейтинг идентификации (*score*). Согласно рекомендациям производителя, положительная идентификация на уровне рода возможна при  $score \geq 1,7$ , на уровне вида – при  $score \geq 2,0$ .  $score < 1,7$  обозначает отсутствие идентификации.

Для уточнения видовой принадлежности микроорганизмов проводили секвенирование фрагмента нуклеотидной последовательно-

сти гена 16S рНК. Тотальную ДНК выделяли по методике, описанной (Wilson, 2003). Амплификацию фрагмента гена 16S рНК осуществляли с универсальными праймерами 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGGTACCTTGTTACGACTT-3') на амплификаторе C 1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США). Очистку ПЦР-продуктов и последующую секвенирующую реакцию выполняли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) по инструкциям производителя на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, США). Сходство последовательностей генов 16S рНК рассчитывали с помощью сервера EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>).

Углеводородокисляющую активность штаммов оценивали по степени деструкции алифатической фракции нефти с помощью метода газовой хроматографии (Vorzenkov et al., 2006). Бактерии культивировали в жидкой среде Раймонда с нефтью (4 % объём.) при 28 °С и 160 об./мин в течение 5 суток. В качестве эталона использовали штамм-нефтедеструктор *Pseudomonas turukhanskensis* IB 1.1 (Коршунова и др., 2016). После инкубации парафиново-нафтеновую фракцию нефти экстрагировали гексаном и анализировали на газовом хроматографе (Кристалл Люкс 4000, Россия) с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой Zebron™ ZB-1XT. Степень биодеструкции нефти (%) рассчитывали на основе хроматографических данных в соответствии с инструкциями к прибору.

Устойчивость штаммов к действию гербицидов определяли визуально по интенсивности роста на ПА с добавлением различных концентраций препаратов (от 1 до 10 мл/л) после 7 суток культивирования при 28 °С. Ис-

пользовали селективные гербициды российского производства:

– Октапон экстра (производитель ООО «АХК-АГРО»), действующее вещество (д.в.) 2,4-дихлор-феноксисукусная кислота (2,4-Д);

– Чисталан (ООО «АХК-АГРО»), д.в. 2,4-Д (2-этилгексилловый эфир) и дикамба (натриевая соль);

– Тапир (ООО «Агро Эксперт Групп»), д.в. имазетапир;

– Гермес (ЗАО «Щелково Агрохим»), д.в. имазамокс и хизалофоп-П-этил;

– Фенизан (ЗАО «Щелково Агрохим»), д.в. дикамба и хлорсульфурон. Готовые препаративные формы были выбраны в связи с тем, что входящие в их состав поверхностно-активные вещества и другие компоненты могут изменять уровень токсичности гербицидов (Rodea-Palomares et al., 2015).

Устойчивость штаммов к тяжелым металлам (Zn, Co, Cd, Pb, Cu, Ni) оценивали визуально по их росту на ПА с солями этих металлов ( $ZnSO_4 \times 6H_2O$ ,  $CoCl_2 \times 2H_2O$ ,  $Cd(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$ ,  $Pb(CH_3COO)_2 \times 3H_2O$ ,  $CuSO_4 \times 5H_2O$ ,  $NiCl_2 \times 6H_2O$ ) после 7 суток культивирования при 28 °С. Концентрацию ионов металлов изменяли от 1 до 10 ммоль/л.

Продукцию штаммами гидролитических ферментов устанавливали следующими методами: протеазы – по разжижению желатины, амилазы – по диаметру зоны гидролиза крахмала, целлюлазы – по наличию зоны растворения карбоксиметилцеллюлозы; липазы – по наличию непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот на среде с Твин 80 (Нетрусов, 2005; Зубов, Толченев, 2012).

Способность штаммов к растворению неорганических фосфатов определяли на среде Пиковской (Пиковская, 1948) со свежесажленным ортофосфатом кальция через 7 суток культивирования. Индекс солюбилизации

(SI) рассчитывали как отношение диаметра зоны просветления вокруг колонии бактерий (мм) к диаметру колонии (мм). Если значение SI было меньше 2, то принимали, что изолят обладает низким потенциалом солюбилизации, если SI был 2–3, то изолят обладает средним потенциалом солюбилизации, если SI больше 3, то изолят обладает высоким потенциалом (Lisboa et al., 2021).

Наличие способности к азотфиксации выявляли по показателям роста на среде Эшби (Нетрусов, 2005) при 28 °С. Штаммы считали активными, если численность их клеток за 72 ч культивирования увеличивалась с  $10^5$  до  $10^9$  КОЕ/мл и более. Меньшая скорость роста интерпретировалась как слабый рост.

Содержание индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в культуральной жидкости анализировали хроматографически так, как это было описано (Стариков, Четвериков, 2020). Отбор проб для оценки содержания ИУК проводили после выращивания бактерий на ПА в течение 5 суток. Культуральную жидкость подвергали центрифугированию при 8000 g с последующей ультрафильтрацией через кассеты с диаметром пор 1 кДа (SARTOCOON Slice Cassete, Германия). Ультрафильтраты анализировали в системе ВЭЖХ LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором SPD-M20A (Shimadzu, Япония). Для хроматографического разделения использовали колонку Zorbax-ODS (250x4,6 мм) (Shimadzu, Япония) в изократическом режиме при соотношении растворителей 0,1 % уксусной кислоты в воде: ацетонитрил – 20:80. Поглощение регистрировали при длине волны 279 нм. Концентрацию ИУК определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандарта (Sigma, США), в интервале концентраций 10–10000 нг/мл.

Наличие у штаммов способности к стимуляции роста растений проверяли на семе-

нах ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Челябинский 99 и клевера лугового (красного) (*Trifolium pratense* L.) сорта Ранний 2. Выбор растений обусловлен тем, что они относятся к разным семействам (*Poaceae* и *Fabaceae*), обладают устойчивостью к нефтяному загрязнению, отзывчивостью на бактеризацию и ранее уже применялись в качестве фитомелиорантов (Ertekin et al., 2011; Karličić et al., 2020; Kuzina et al., 2021; Sawicka et al., 2022). Инокуляцию семян проводили в течение 15 мин. Необходимое количество жидкой культуры бактерий рассчитывали таким образом, чтобы титр клеток на семени составлял  $10^5$  КОЕ для ячменя и  $10^4$  КОЕ для клевера. Контрольные семена обрабатывали водопроводной водой. Семена ячменя (15 шт.) и клевера (20 шт.) раскладывали на почве и инкубировали при 24–26 °С в течение 3 и 4 суток соответственно, после чего определяли всхожесть, длину побегов и длину корней (у ячменя измеряли суммарную длину корней). Влажность почвы в течение опыта поддерживали на уровне 60 % от полной влагоемкости.

Для проверки влияния штаммов на рост растений в условиях нефтяного загрязнения почву загрязняли нефтью (2 % масс.), ровным слоем раскладывали в чашки Петри (по 40 г в чашку) и оставляли на 2 суток для выветривания токсичных летучих компонентов. Далее эксперимент проводили так, как это было описано выше.

Для оценки влияния бактерий на рост и развитие растений при загрязнении гербицидом в чашки Петри помещали по 40 г почвы и увлажняли ее до 60 % от полной влагоемкости. Почву обрабатывали раствором гербицида Тапир (концентрация 4 мл/л). В одну чашку вносили по 180 мкл рабочего раствора гербицида (при расчете учитывали площадь почвенной пластинки). Количество гербицида было увеличено в 2 раза по срав-

нению с расходом, рекомендованным производителем. После обработки почву перемешивали и раскладывали на ее поверхности семена клевера (20 шт.). Бактеризацию семян проводили, как описано выше. Чашки инкубировали при температуре 24–26 °С в течение 4 суток. После этого подсчитывали всхожесть семян и измеряли длину побегов и корней.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных программ MS Excel. На рисунках и в таблицах данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

### Результаты

Из 54 визуально различающихся при выращивании на ПА изолятов для дальнейших исследований были отобраны 18, которые характеризовались наиболее интенсивным ростом на агаризованной и жидкой среде Раймонда с нефтью. При культивировании каждого изолята в жидкой среде наблюдалось уменьшение нефтяной пленки на ее поверхности и на стенках колб, диспергирование нефти, образование хлопьев и сдвиг pH в кислую сторону с 6,70–6,74 в начале инкубации до 5,56–6,38 – в конце. У этих изолятов был проведен МАЛДИ-масс-спектрометрический анализ фракции клеточных белков, согласно данным которого 7 изолятов из 18 были отнесены к роду *Pseudomonas* (UOM 9, UOM 10, UOM 11, UOM 13, UOM 14, UOM 15, UOM 16). *Score* штаммов UOM 9 и UOM 15 был равен 1,903 и 1,989, что соответствует высокой степени точности родовой идентификации. У UOM 10, UOM 11, UOM 13, UOM 14, UOM 16 значение *score* составляло 2,073–2,201. Это соответствует высокой степени видовой идентификации (табл. 1). У всех штаммов псевдомонад был проведен сравнительный анализ нуклеотидной по-

Таблица 1. Изоляты, идентифицированные с помощью МАЛДИ–ВП масс-спектрометрии и секвенирования гена 16S рРНК

Table 1. Isolates identified by MALDI–TOF mass-spectrometry and 16S rRNA gene sequencing

Изолят	Идентификация с помощью МАЛДИ–ВП масс-спектрометрии (score; уровень идентификации)	Идентификация с помощью секвенирования гена 16S рРНК, наиболее близкий типовой штамм (% сходства)	№ нуклеотидной последовательности в GenBank
UOM 9	<i>Pseudomonas</i> spp. (1,903; B)	<i>P. silesiensis</i> A3 <sup>T</sup> (99,50)	OQ439800
UOM 10	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (2,122; A)	<i>P. alcaligenes</i> NBRC 14159 <sup>T</sup> (99,15)	OP692728
UOM 11	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> (2,073; A)	<i>P. frederiksbergensis</i> JAJ28 <sup>T</sup> (99,72)	OP692729
UOM 13	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i> (2,186; A)	<i>P. arsenicoxydans</i> CECT 7543 <sup>T</sup> (99,44)	OQ439801
UOM 14	<i>Pseudomonas jessenii</i> (2,201; A)	<i>P. jessenii</i> DSM 17150 <sup>T</sup> (99,86)	OQ439802
UOM 15	<i>Pseudomonas</i> spp. (1,989; B)	<i>P. zhaodongensis</i> NEAU-ST5–21 <sup>T</sup> (99,01)	OQ439803
UOM 16	<i>Pseudomonas avellanae</i> (2,154; A)	<i>P. avellanae</i> BPIC 631 <sup>T</sup> (99,15)	OQ439804

Примечание. А – идентификация до вида, В – идентификация до рода

следовательности гена 16S рРНК, а сами последовательности депонированы в GenBank (табл. 1). Таким образом, по совокупности результатов проведенных исследований было установлено, что штамм UOM 9 принадлежит к виду *P. silesiensis*, UOM 10 – *P. alcaligenes*,

UOM 11 – *P. frederiksbergensis*, UOM 13 – *P. arsenicoxydans*, UOM 14 – *P. jessenii*, UOM 15 – *P. zhaodongensis*, UOM 16 – *P. avellanae*.

Бактерии обладали разной способностью к разложению нефти в жидкой среде (рис. 1). Степень биодеструкции у *P. silesiensis* UOM 9,

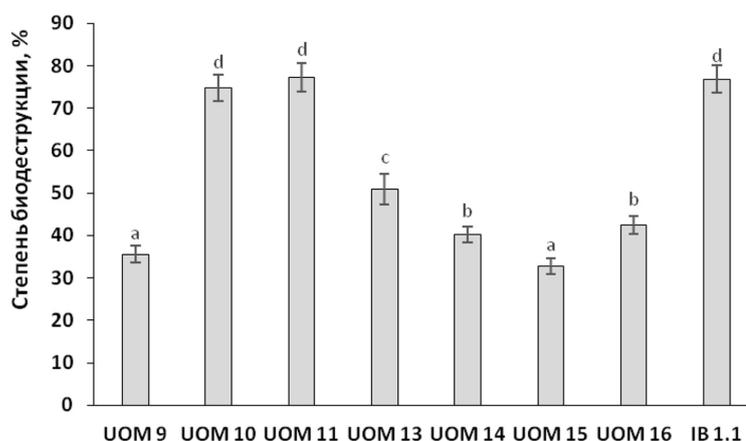


Рис. 1. Степень биодеструкции нефти штаммами псевдомонад. Статистически отличающиеся средние значения отмечены разными буквами ( $p \leq 0,05$ ). UOM 9, UOM 10, UOM 11, UOM 13, UOM 14, UOM 15 и UOM 16, IB 1.1 – штаммы *P. silesiensis* UOM 9, *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. arsenicoxydans* UOM 13, *P. jessenii* UOM 14, *P. zhaodongensis* UOM 15, *P. avellanae* UOM 16, *P. turukhanskensis* IB 1.1 соответственно

Fig. 1. Degree of oil biodegradation by pseudomonad strains. Statistically different means are marked with different letters ( $p \leq 0.05$ ). UOM 9, UOM 10, UOM 11, UOM 13, UOM 14, UOM 15, UOM 16, and IB 1.1 – treatments with *P. silesiensis* UOM 9, *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. arsenicoxydans* UOM 13, *P. jessenii* UOM 14, *P. zhaodongensis* UOM 15, *P. avellanae* UOM 16, and *P. turukhanskensis* IB 1.1, respectively

*P. jessenii* UOM 14, *P. zhaodongensis* UOM 15, *P. avellanae* UOM 16 составляла 32,7–42,4 %, у *P. arsenicoxydans* UOM 13–50,8 %. Самый высокий уровень деградации нефти зафиксирован для штаммов *P. alcaligenes* UOM 10 (74,8 %) и *P. frederiksbergensis* UOM 11 (77,3 %). Эти показатели были равны таковому у эталонного штамма-нефтедеструктора *P. turukhanskensis* IB 1.1 (76,8 %).

Несмотря на то что гербициды Октапон экстра, Тапир и Гермес содержат разные действующие вещества, все штаммы обладали устойчивостью к ним во всем диапазоне концентраций, что свидетельствует об отсутствии токсичности этих препаратов для изучаемых бактерий. Исключение составлял *P. jessenii*

UOM 14, который не выдерживал присутствия Октапон экстра более 5 мл/л. Устойчивость бактерий к Чисталану и Фенизану была намного ниже (не более 5 мл/л). Штаммы *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. jessenii* UOM 14, *P. zhaodongensis* UOM 15 не росли при концентрации Чисталана выше 1 мл/л (табл. 2).

Среди всех изучаемых микроорганизмов *P. jessenii* UOM 14 проявил самую высокую устойчивость к четырем тяжелым металлам из шести (свинец, кадмий, цинк, медь). Наиболее токсичным для микроорганизмов был кадмий. Он полностью подавлял рост некоторых штаммов (*P. alcaligenes* UOM 10 и *P. zhaodongensis* UOM 15). Наименее токсичными были свинец, цинк и никель. Псевдомо-

Таблица 2. Свойства штаммов псевдомонад

Table 2. Properties of pseudomonad strains

Свойство		Штамм						
		UOM 9	UOM 10	UOM 11	UOM 13	UOM 14	UOM 15	UOM 16
Максимальная концентрация* гербицидов, г/л	Октапон экстра	10	10	10	10	5	10	10
	Чисталан	5	5	1	5	1	1	5
	Тапир	10	10	10	10	10	10	10
	Гермес	10	10	10	10	10	10	10
	Фенизан	5	5	5	5	5	5	5
Максимальная концентрация* тяжелых металлов, ммоль/л	Pb <sup>2+</sup>	5	5	5	5	6	5	5
	Zn <sup>2+</sup>	4	4	4	4	8	4	4
	Cd <sup>2+</sup>	1	-	1	1	2	-	1
	Co <sup>2+</sup>	3	3	4	3	3	2	4
	Cu <sup>2+</sup>	2	3	3	2	4	3	2
	Ni <sup>2+</sup>	4	4	4	4	4	4	4
Продукция гидролитических ферментов	липаза	-	+	+	+	+	+	-
	амилаза	-	-	-	-	-	+	-
	протеаза	-	+	-	-	+	-	-
	целлюлаза	-	-	-	-	-	+	-
Индекс солюбилизации		2,2±0,2	1,8±0,1	3,2±0,2	2,3±0,2	2,0±0,1	1,8±0,2	3,0±0,2
Азотфиксация		+	+	+	+	+	+	+
Продукция ИУК, нг/мл		539±29	1627±75	898±40	305±22	1615±69	975±48	940±53

Примечание. Прочерк – отсутствие признака, + – наличие признака. UOM 9, UOM 10, UOM 11, UOM 13, UOM 14, UOM 15 и UOM 16 – штаммы *P. silesiensis* UOM 9, *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. arsenicoxydans* UOM 13, *P. jessenii* UOM 14, *P. zhaodongensis* UOM 15, *P. avellanae* UOM 16 соответственно. \* – максимальная концентрация, при которой еще возможен рост бактерий.

нады (исключение *P. jessenii* UOM 14) проявляли одинаковую устойчивость к ионам этих металлов (не более 4–5 ммоль/л) (табл. 2).

Бактерии *P. silesiensis* UOM 9 и *P. avellanae* UOM 16 не продуцировали энзимы из тестируемого набора, *P. zhaodongensis* UOM 15 образовывал липазу, амилазу и целлюлазу. Большинство штаммов (5 из 7) обладали липазной активностью (табл. 2).

Все микроорганизмы продемонстрировали хорошие показатели роста на среде Эшби, не содержащей азота и были способны к растворению фосфата кальция, но в разной степени. *P. alcaligenes* UOM 10 и *P. zhaodongensis* UOM 15 обладали низким потенциалом солюбилизации (SI меньше 2), *P. frederiksbergensis* UOM 11 – высоким (SI больше 3), остальные бактерии имели средний потенциал (SI 2–3) (табл. 2). Кроме того, исследуемые штаммы синтезировали ИУК от 305 (*P. arsenicoxydans* UOM 13) до 1627 нг/мл культуральной жидкости (*P. alcaligenes* UOM 10) (табл. 2).

Всхожесть семян ячменя независимо от варианта опыта на чистой почве составляла 100 %. Обработка штаммами *P. alcaligenes* UOM 10, *P. zhaodongensis* UOM 15 и *P. avellanae* UOM 16 приводила к удлинению побегов на 12,1–21,9 %, а использование *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. jessenii* UOM 14, *P. zhaodongensis* UOM 15 и *P. avellanae* UOM 16 увеличивало суммарную длину корней на 26,4–49,4 % (рис. 2). Всхожесть семян клевера в контроле составила 72 %. Бактеризация всеми штаммами увеличивала ее до 77–86 % и способствовала росту побегов и корней проростков на 19,9–34,0 и 23,5–48,0 % (рис. 3).

Всхожесть семян на нефтезагрязненной почве в целом осталась такой же, как и на чистой почве, хотя нефть оказывала заметное негативное воздействие на развитие обоих растений. Длина корней и побегов ячменя

в контроле уменьшилась на 34,6 и 45,1 %, клевера – на 27,5 и 33,3 % соответственно (рис. 2, 3). Соотношение корень/побег у обоих растений выросло по сравнению с этим же показателем на чистой почве (табл. 3). Под влиянием бактериализации растения смогли компенсировать отставание в росте корней и частично побегов. Корни инокулированных растений ячменя на нефтезагрязненной почве были сопоставимы по длине с корнями контрольных растений на чистой почве. В присутствии нефти длина корней проростков клевера при интродукции штаммов *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. zhaodongensis* UOM 15 и *P. avellanae* UOM 16 была выше, чем в чистом контроле на 24,5–35,3 %. В нефтесодержащей почве инокулированные растения ячменя имели более длинные побеги, чем у необработанных растений в контроле (на 22,9–32,2 % при внесении штаммов *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksbergensis* UOM 11, *P. zhaodongensis* UOM 15 и *P. avellanae* UOM 16). В этих же условиях длина побегов клевера после инокуляции выросла на 18,1–26,6 %. Таким образом, использование бактерий положительно влияло на морфометрические показатели растений в чистой и нефтезагрязненной почве. Соотношение корень/побег при обработке бактериями увеличилось и на чистой и на загрязненной почве, но максимальные значения у обработанных растений зафиксированы на почве с нефтью (табл. 3).

Гербицид Тапир предназначен для уничтожения двудольных и злаковых сорняков в посевах бобовых растений. Он плохо поддается разложению и может накапливаться в почве, поэтому ростстимулирующую активность штаммов оценивали именно в его присутствии. Предварительно нами установлено, что ячмень был устойчив к воздействию данного препарата, поэтому в качестве тест-объекта использовали клевер. Всхожесть се-

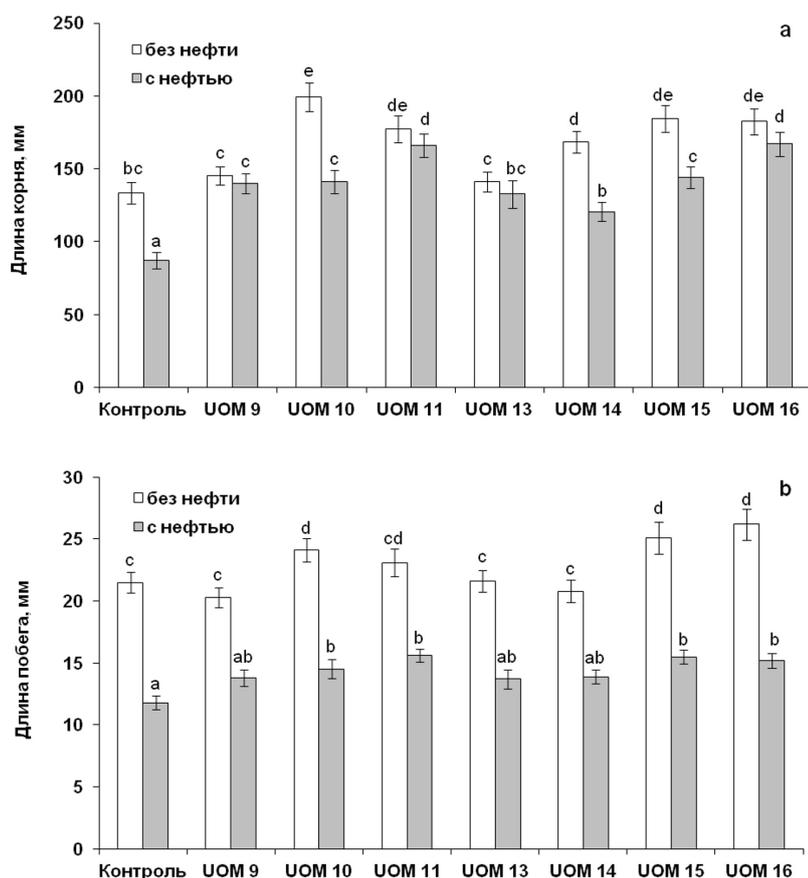


Рис. 2. Влияние бактериализации на длину корней (а) и побегов (б) растений ячменя. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами ( $p \leq 0,05$ ). Обозначение штаммов как на рис. 1

Fig. 2. Effect of bacterization on the length of roots (a) and shoots (b) of barley plants. Statistically different means for each indicator are marked with different letters ( $p \leq 0.05$ ). Designation of strains as in Fig. 1

мян и морфометрические показатели его проростков на почве, обработанной гербицидом, оказались значительно ниже, чем на чистой почве. Всхожесть уменьшилась с 72 до 52 %, длина корня и побега сократилась на 12,7 и 26,9 % соответственно (рис. 4). Отношение длины корня к длине побега увеличилось с 0,72 до 0,86 (табл. 3).

Бактеризация семян клевера перед их проращиванием на почве с гербицидом улучшила все три анализируемых показателя. Всхожесть семян составила 76–84 %, а длина побегов выросла на 28,2–47,6 %. Длина корней также увеличилась, но достоверные

отличия от контроля (на 22,5–29,2 %) были установлены только в вариантах со штаммами *P. alcaligenes* UOM 10, *P. frederiksborgensis* UOM 11 и *P. avellanae* UOM 16. Отношение длины корня к длине побега у обработанных растений приблизилось к значению данного показателя на чистой почве и составило 0,69–0,78 (табл. 3).

### Обсуждение

В мире накоплен большой научно-практический опыт ликвидации последствий нефтяного загрязнения (Lim et al., 2016). Однако учитывая важную роль углеводородно-

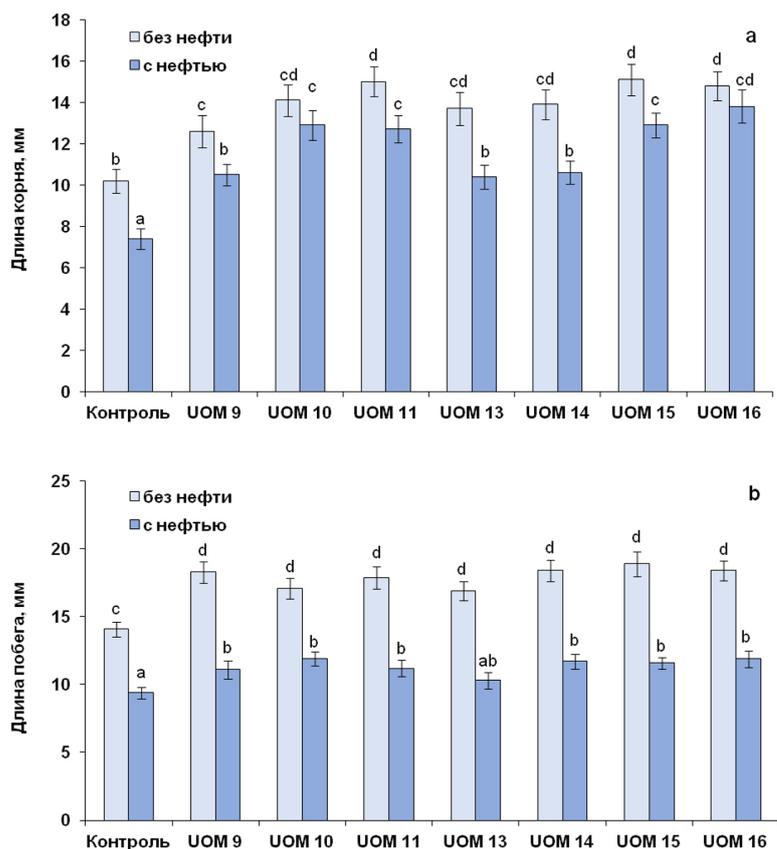


Рис. 3. Влияние бактериализации на длину корней (а) и побегов (б) растений клевера. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами ( $p \leq 0,05$ ). Обозначение штаммов как на рис. 1

Fig. 3. Effect of bacterization on the length of roots (a) and shoots (b) in clover plants. Statistically different means for each indicator are marked with different letters ( $p \leq 0.05$ ). Designation of strains as in Fig. 1

Таблица 3. Соотношение корень/побег у растений ячменя и клевера

Table 3. Root/shoot ratio in barley and clover plants

Растение	Почва	Вариант							
		Контроль	UOM 9	UOM 10	UOM 11	UOM 13	UOM 14	UOM 15	UOM 16
Ячмень	чистая	6,2	7,2	8,3	7,7	6,5	8,1	7,3	6,9
	с нефтью	7,4	10,1	9,7	10,7	9,7	8,7	9,3	11,0
Клевер	чистая	0,72	0,69	0,82	0,84	0,81	0,76	0,79	0,80
	с нефтью	0,79	0,95	1,08	1,13	1,01	0,91	1,11	1,16
	с гербицидом	0,86	0,75	0,78	0,77	0,75	0,72	0,69	0,76

Примечание. Обозначение штаммов как в табл. 1.

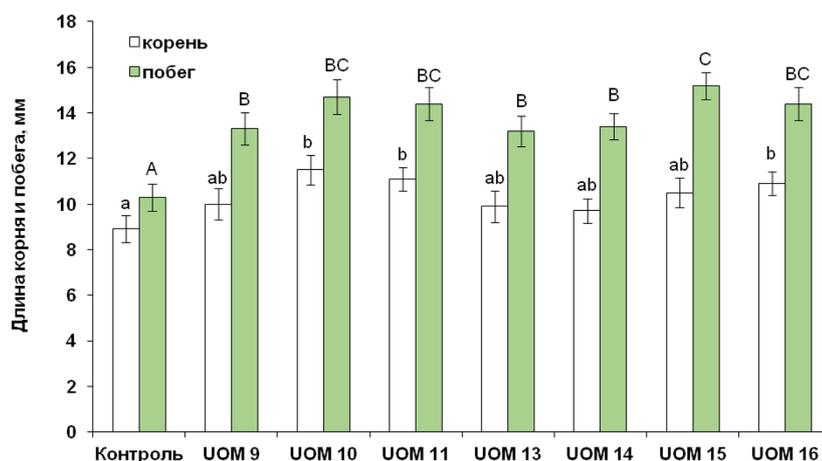


Рис. 4. Влияние бактериализации на длину корней и побегов растений клевера в присутствии гербицида. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами ( $p \leq 0,05$ ). Обозначение штаммов как на рис. 1

Fig. 4. Effect of bacterization on the length of roots and shoots in clover plants in the presence of herbicide. Statistically different means for each indicator are marked with different letters ( $p \leq 0.05$ ). Designation of strains as in Fig. 1

го сырья в мировой экономике, а также разнообразии почвенно-климатических условий и неодинаковости качественного и количественного состава нефти и нефтепродуктов, задача разработки и внедрения эффективных способов очистки и восстановления территорий, загрязненных углеводородами, по-прежнему очень актуальна. В настоящем исследовании были выделены и идентифицированы 7 штаммов углеводородокисляющих псевдомонад, которые проявили разную степень деструкции нефти (32,7–77,3 %) (рис. 1). Наиболее эффективными оказались *P. alcaligenes* UOM 10 и *P. frederiksbergensis* UOM 11. Они являются представителями видов, которые хорошо известны своей способностью к разложению нефти, нефтепродуктов и полициклических ароматических углеводородов (Gofar, 2013; Adeleye et al., 2018; Wang et al., 2020; Ruiz et al., 2021). Дополнительным преимуществом выделенных бактерий является наличие способности к синтезу липазы (табл. 2). Этот фермент может служить эффек-

тивным средством для разложения углеводов (Bamitale, Ayomikun, 2020), а липазная активность микроорганизмов используется для мониторинга биодegradации нефти и нефтепродуктов в процессе биоремедиации (Margesin et al., 2007).

В настоящее время антропогенное загрязнение почв чаще всего имеет комплексный характер. Примером такого негативного воздействия может служить контаминация нефтью и пестицидами (Guo et al., 2016; Martínez et al., 2022). Она возникает при авариях на нефтепроводах, проходящих через сельскохозяйственные угодья, на которых применялись химические средства защиты растений. Наличие дополнительных поллютантов ингибирует жизнедеятельность аутохтонной углеводородокисляющей микробиоты и приводит к снижению эффективности самоочищения нефтезагрязненной почвы (Dai et al., 2020). Поэтому для ее биорекультивации следует использовать микроорганизмы-нефтедеструкторы, устойчивые к присут-

ствию других загрязнителей. Все выделенные нами штаммы псевдомонад обладали одинаково высокой устойчивостью к гербицидам Октапон экстра, Тапир и Гермес, несмотря на то, что их действующие вещества относятся к разным классам химических соединений. Устойчивость к Чисталану и Фенизану была минимум в 2 раза ниже (табл. 2). В состав этих двух препаратов входит дополнительный компонент дикамба, который мог оказать негативное влияние на рост бактерий.

Кроме гербицидов, в нефтезагрязненных сельскохозяйственных почвах могут содержаться тяжелые металлы. Они накапливаются при разливах сырой нефти, а также при нарушении регламента применения пестицидов и удобрений (Masindi, Muedi, 2018) и обладают собственной токсичностью, в том числе по отношению к микроорганизмам (Etesami, 2018). На сегодняшний момент нет единого мнения о том, какая концентрация служит границей разделения штаммов на устойчивые и неустойчивые к воздействию тяжелых металлов. Например, было предложено, что псевдомонады, рост которых не ингибируется  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  в концентрации 1 ммоль/л, являются устойчивыми к воздействию никеля, цинка и свинца (Ceylan, Uğur, 2012). В работе (Zhang et al., 2016) бактерии рода *Pseudomonas*, изолированные из воды, содержащей соли металлов (оборотная охлаждающая вода металлургического завода), считали устойчивыми, если они росли в присутствии никеля, цинка и свинца в количестве 3,5–4,0, 2,5–3,0 и 2,5–3,0 ммоль/л соответственно. Выделенные в настоящем исследовании бактерии проявляли устойчивость к ионам свинца, цинка и никеля в количестве 4,0–5,0 ммоль/л (исключение *P. jessenii* UOM 14) (табл. 2). Эта особенность может служить дополнительным преимуществом штаммов при отборе агентов для биоремеди-

ации нефтезагрязненных сельскохозяйственных почв.

Для повышения эффективности очистки почв часто сочетают микробиологическую деструкцию и фиторемедиацию. Микроорганизмы, которые используют для этого, должны не только разрушать поллютанты, но и стимулировать рост растений, т.е. обладать PGP-свойствами (от англ. plant growth-promoting – стимулирование роста растений). Поэтому представлялось важным выяснить, относятся ли изучаемые углеводородокисляющие псевдомонады к группе PGPB (от англ. plant growth-promoting bacteria – бактерии, стимулирующие рост растений). В частности, могут ли они увеличивать для растений доступность азота и фосфора, которые являются ключевыми элементами в минеральном питании растений (Mäkelä et al., 2020). При этом содержащийся в почве фосфор практически недоступен растениям из-за плохой растворимости и образования комплексов с металлами (Ando et al., 2021). В связи с этим штаммы, обладающие азотфиксирующей и фосфатмобилизирующей активностью, имеют большое практическое значение для экологической и сельскохозяйственной биотехнологии. Изучаемые в данной работе бактерии имели потенциал для фиксации атмосферного азота. Они активно росли на среде, не содержащей азота, т.е. являются по меньшей мере олигонитрофилами. Кроме того, штаммы были способны к фосфатмобилизации. Особенно перспективным с этой точки зрения был штамм *P. frederiksbergensis* UOM 11, у которого был высокий индекс солубилизации (3,2) (табл. 2), что характерно для многих представителей этого вида (Zeng et al., 2016).

Бактеризация положительно воздействовала на длину корней и побегов ячменя и клевера в чистой и нефтезагрязненной почве, а также

на рост и развитие проростков клевера в почве с гербицидом (рис. 2–4). Способность бактерий увеличивать ростовые показатели растений (длину корней, в частности) имеет очень большое значение при проведении биоремедиации с помощью микробно-растительных комплексов. Так как попадание углеводов в почву уменьшает влагоудерживающую способность и аэрируемость почвы, а также доступность элементов минерального питания (Devatha et al., 2019), то усиление роста подземной части является важной ответной реакцией растений на нефтяной стресс.

Как известно, продукция бактериями фитогормонов играет важную роль в их стимулирующем влиянии на растения (Kudoyarova et al., 2019). Ауксины являются основными регуляторами роста и развития растений, а ИУК (индолил-3-уксусная кислота) – наиболее распространенным индольным соединением этой группы. Все исследуемые штаммы синтезировали ИУК, но по ее содержанию в культуральной жидкости их можно разделить на две группы: микроорганизмы с низким уровнем продукции ИУК (*P. silesiensis* UOM 9 и *P. arsenicoxydans* UOM 13 и со средним (табл. 2). Видимо, именно количеством продуцируемой ИУК, которая в числе прочего усиливает рост подземной части растений (Kudoyarova et al., 2019), можно объяснить то, что исследуемые микроорганизмы в разной степени способствовали возрастанию длины корней у обоих растений в загрязненной почве (рис. 2а, 3а). Так, *P. silesiensis* UOM 9 и *P. arsenicoxydans* UOM 13, выделяющие меньше всего этого фитогормона (539 и 305 нг/мл), оказывали более слабое стимулирующее действие, чем остальные штаммы. Вместе с тем штаммы *P. alcaligenes* UOM 10 и *P. jessenii* UOM 14, образующие одинаковое количество ауксина (1627 и 1615 нг/мл), отличались друг от друга по способности усили-

вать рост растений. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что стимуляция роста растений обусловлена комплексным воздействием микроорганизмов, и высокая концентрация ИУК в культуральной жидкости не гарантирует наличие ростстимулирующего эффекта от бактериализации (Ali et al., 2009).

Соотношение корень/побег характеризует условия произрастания растений. Чем хуже обеспеченность растений питательными веществами и водой, тем это соотношение выше. На примере обоих растений видно, что при контаминации почвы нефтью и гербицидом оно увеличилось. Для ячменя в чистой и нефтезагрязненной почве оно составило 6,2 и 7,4 (табл. 3). При бактериализации соотношение корень/побег у растений ячменя на почве с нефтью оказалось больше, чем в варианте без инокуляции в 1,2–1,5 раза. Это свидетельствует о том, что под воздействием микроорганизмов растения на ранних этапах своего развития смогли сформировать более мощную корневую систему, которая в дальнейшем должна обеспечить активный рост надземной части.

При изучении растений клевера можно было сравнить, как интродукция бактерий влияет на их развитие в присутствии разных ксенобиотиков. Как и у ячменя, инокуляция клевера приводила к еще большему усилению корнеобразования в нефтесодержащей почве. Соотношение корень/побег увеличилось по сравнению с контролем тоже в 1,2–1,5 раза. Совершенно другая зависимость была обнаружена в почве, загрязненной гербицидом Тапир. Внесение микроорганизмов привело к уменьшению соотношения корень/побег по сравнению с необработанными растениями (0,86 на контроле и 0,69–0,78 в вариантах с применением псевдомонад) (табл. 3). Это значит, что бактериализованные растения успешно преодолели стресс и сохранили ро-

стовые показатели на уровне растений, развивавшихся на чистой почве.

Таким образом, предпосевная обработка семян способствовала лучшей адаптации растений к условиям абиотического стресса, вызванного разными поллютантами. Растения смогли практически полностью нивелировать последствия от наличия в почве гербицида, а негативное влияние нефти на ростовые характеристики было компенсировано частично. По всей видимости, это связано с тем, что для развития растений большим препятствием являлось не токсическое воздействие поллютантов, а наличие у нефти способности оказывать отрицательное влияние на физико-химические и структурные свойства почвы.

### Заключение

В настоящем исследовании выделены и идентифицированы 7 штаммов углеводородокисляющих псевдомонад, устойчивых к гербицидам на основе различных действующих веществ (2,4-D, имазетапира, смеси

имазамокса и хизалофоп-П-этила). Все изученные бактерии обладали PGP-свойствами и в разной степени стимулировали рост корней и побегов ячменя и клевера в чистой и нефтезагрязненной почве, а также положительно влияли на проростки клевера в почве с гербицидом, тем самым помогая растениям преодолевать стресс, вызванный присутствием поллютантов. Наибольшим потенциалом в качестве основы микробно-растительных комплексов для биоремедиации нефтезагрязненных сельскохозяйственных почв обладал штамм *P. frederiksbergensis* UOM 11 благодаря наличию у него высокой способности к деградации нефти и стимуляции роста и развития растений. Однако остальные штаммы тоже имеют перспективы для использования в процессе очистки и восстановления почв: *P. alcaligenes* UOM 10 как нефтеструктор, а остальные бактерии – как PGPB. Полученные результаты можно будет использовать при разработке способов биоремедиации комплексно загрязненных почв.

### Список литературы / References

Зубов Д. В., Толченев А. А. (2012) Экспресс-методика контроля активности ферментного комплекса. *Вестник Саратовского государственного технического университета*, 2: 389–392 [Zubov D. V., Tolchenov A. A. (2012) Rapid method for control activity of enzyme complex. *Bulletin of Saratov State Technical University* [Vestnik Saratovskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta], 2: 389–392 (in Russian)]

Коршунова Т. Ю., Четвериков С. П., Валиуллин Э. Г., Логинов О. Н. (2016) Биотехнологический потенциал бактерии *Pseudomonas* sp. ИБ-1.1 как основы полифункционального биопрепарата. *Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология*, 6(1): 93–99 [Korshunova T. Yu., Chetverikov S. P., Valiullin E. G., Loginov O. N. (2016) Biotechnological potential of the bacterium *Pseudomonas* sp. IB-1.1 as bases of the multifunctional biological product. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology* [Izvestiya VUZov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya], 6(1): 93–99 (in Russian)]

Нетрусов А. И. (2005) *Практикум по микробиологии*. Москва, Академия, 608 с. [Netrusov A. I. (2005) *Practicals in microbiology*. Moscow, Akademiya, 608 p. (in Russian)]

Пиковская Р. И. (1948) Мобилизация фосфатов в почве в связи с жизнедеятельностью некоторых видов микробов. *Микробиология*, 17: 362–370 [Pikovskaya R. I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil due to microbial activity. *Microbiology* [Mikrobiologiya], 17: 362–370 (in Russian)]

Стариков С. Н., Четвериков С. П. (2020) Штамм *Enterobacter* sp. UOM-3 способен к синхронной деструкции галогенсодержащих гербицидов и синтезу индол-3-уксусной кислоты. *Экобиотех*, 3(4): 716–721 [Starikov S. N., Chetverikov S. P. (2020) Strain *Enterobacter* sp. UOM-3 is able to synchronous destruction of halogen-containing herbicides and synthesis of indol-3-acetic acid. *Ecobiotech* [Ekobiotekh], 3(4): 716–721 (in Russian)]

Adeleye A. O., Nkerekwem M. E., Omokhudu G. I., Amoo A. O., Shiaka G. P., Yerima M. B. (2018) Effect of microorganisms in the bioremediation of spent engine oil and petroleum related environmental pollution. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 22(2): 157–167

Ali B., Sabri A. N., Ljung K., Hasnain S. (2009) Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Letters in Applied Microbiology*, 48(5): 542–547

Ando K., Yamaguchi N., Nakamura Y., Kasuya M., Taki K. (2021) Speciation of phosphorus accumulated in fertilized cropland of Aichi prefecture in Japan with different soil properties by sequential chemical extraction and P K-edge XANES. *Soil Science and Plant Nutrition*, 67(2): 150–161

Bamitale O. M., Ayomikun A. M. (2020) Biodegradation potential of tropical hydrocarbon degrading *Providencia stuartii*. *Trends in Applied Sciences Research*, 15(3): 253–259

Borzenkov I. A., Milekhina E. I., Gotoeva M. T., Rozanova E. P., Belyaev S. S. (2006) The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, Western Siberia, and Vietnam. *Microbiology*, 75(1): 66–72

Ceylan Ö., Uğur A. (2012) Bio-monitoring of heavy metal resistance in *Pseudomonas* and *Pseudomonas* related genus. *Journal of Biological & Environmental Sciences*, 6(18): 233–242

Dai Y., Liu R., Zhou Y., Li N., Hou L., Ma Q., Gao B. (2020) Fire Phoenix facilitates phytoremediation of PAH-Cd co-contaminated soil through promotion of beneficial rhizosphere bacterial communities. *Environment International*, 136: 105421

Devatha C. P., Vishnu Vishal A., Purna Chandra Rao J. (2019) Investigation of physical and chemical characteristics on soil due to crude oil contamination and its remediation. *Applied Water Science*, 9: 89

Ebadi A., Khoshkholgh Sima N. A., Olamaee M., Hashemi M., Ghorbani Nasrabadi R. (2018) Remediation of saline soils contaminated with crude oil using the halophyte *Salicornia persica* in conjunction with hydrocarbon-degrading bacteria. *Journal of Environmental Management*, 219: 260–268

Ertekin O., Erol C., Unlu S., Yildizhan Y., Pelitli V., Yuksel B., Memon A. (2011) Aliphatic hydrocarbon fingerprints in *Trifolium* spp. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(2): 367–371

Etesami H. (2018) Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 175–191

Gofar N. (2013) Synergism of wild grass and hydrocarbonoclastic bacteria in petroleum biodegradation. *Journal of Tropical Soils*, 18(2): 161–168

Guo M., Gong Z., Allinson G., Tai P., Miao R., Li X., Jia C., Zhuang J. (2016) Variations in the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial and agricultural soils after bioremediation. *Chemosphere*, 144: 1513–1520

Gupta P. K. (2017) Herbicides and fungicides. *Reproductive and developmental toxicology*. Gupta R. C. (Ed.) Academic Press, p. 657–679

Islas-García A., Vega-Loyo L., Aguilar-López R., Xoconostle-Cázares B., Rodríguez-Vázquez R. (2015) Evaluation of hydrocarbons and organochlorine pesticides and their tolerant microorganisms from an agricultural soil to define its bioremediation feasibility. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(2): 99–108

Kahlon R.S. (2016) Biodegradation and bioremediation of organic chemical pollutants by *Pseudomonas*. *Pseudomonas: molecular and applied biology*. Kahlon R.S. (Ed.) Springer, Cham, Switzerland, p. 343–417

Karličić V.M., Radić D.S., Jovičić-Petrović J.P., Raičević V.B. (2020) Red clover and plant growth promoting bacteria: the combination that can speed up soil remediation rate. *Journal of Agricultural Sciences (Belgrade)*, 65(2): 163–174

Korshunova T. Yu., Bakaeva M.D., Kuzina E.V., Rafikova G.F., Chetverikov S.P., Chetverikova D.V., Loginov O.N. (2021) Role of bacteria of the genus *Pseudomonas* in the sustainable development of agricultural systems and environmental protection (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 57(3): 281–296

Korshunova T. Yu., Mukhamatdyarova S.R., Loginov O.N. (2015) Taxonomic classification of the oil destructing bacterium using mass spectrometry methods by the results of analysis of cellular proteins and study of cellular fatty acids. *Biology Bulletin*, 42(3): 220–225

Kudoyarova G., Arkhipova T., Korshunova T., Bakaeva M., Loginov O., Dodd I.C. (2019) Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1368

Kuzina E., Rafikova G., Vysotskaya L., Arkhipova T., Bakaeva M., Chetverikova D., Kudoyarova G., Korshunova T., Chetverikov S. (2021) Influence of hydrocarbon-oxidizing bacteria on the growth, biochemical characteristics, and hormonal status of barley plants and the content of petroleum hydrocarbons in the soil. *Plants*, 10(8): 1745

Lim M.W., Lau E.V., Poh P.E. (2016) A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil – present works and future directions. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1): 14–45

Lisboa P.H. G., de Andrade P.H. M., Machado P.C., de Sousa C.P., Lacava P.T. (2021) Isolation and in vitro screening of plant growth-promoting rhizobacteria from *Solanum lycocarpum* St. Hil., an endemic plant of the Brazilian tropical savannah. *African Journal of Microbiology Research*, 15(5): 253–261

Mahapatra K., De S., Banerjee S., Roy S. (2019) Pesticide mediated oxidative stress induces genotoxicity and disrupts chromatin structure in fenugreek (*Trigonella foenum – graecum* L.) seedlings. *Journal of Hazardous Materials*, 369: 362–374

Margesin R., Hämmerle M., Tschërko D. (2007) Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microbial Ecology*, 53(2): 259–269

Martínez B.C. S., Benavides L.M., Santoyo G., Sánchez-Yáñez J. M. (2022) Biorecovery of agricultural soil impacted by waste motor oil with *Phaseolus vulgaris* and *Xanthobacter autotrophicus*. *Plants*, 11(11): 1419

Masindi V., Muedi K.L. (2018) Environmental contamination by heavy metals. *Heavy Metals*. IntechOpen, London, p. 115–132

Meena R.S., Kumar S., Datta R., Lal R., Vijayakumar V., Brtnický M., Sharma M.P., Yadav G.S., Jhariya M.K., Jangir C.K., Pathan S.I., Dokulilova T., Pecina V., Marfo T.D. (2020) Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: a review. *Land*, 9(2): 34

- Michael-Igolima U., Abbey S. J., Ifelebuegu A. O. (2022) A systematic review on the effectiveness of remediation methods for oil contaminated soils. *Environmental Advances*, 9: 100319
- Mäkelä P. S. A., Wasonga D. O., Solano Hernandez A., Santanen A. (2020) Seedling growth and phosphorus uptake in response to different phosphorus sources. *Agronomy*, 10(8): 1089
- Raymond R. L. (1961) Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. *Developments in Industrial Microbiology*, 2: 23–32
- Rodea-Palomares I., Makowski M., Gonzalo S., González-Pleiter M., Leganés F., Fernández-Piñas F. (2015) Effect of PFOA/PFOS pre-exposure on the toxicity of the herbicides 2,4-D, Atrazine, Diuron and Paraquat to a model aquatic photosynthetic microorganism. *Chemosphere*, 139: 65–72
- Ruiz O. N., Radwan O., Striebich R. C. (2021) GC–MS hydrocarbon degradation profile data of *Pseudomonas frederiksbergensis* SI8, a bacterium capable of degrading aromatics at low temperatures. *Data in Brief*, 35: 106864
- Sawicka B., Vambol V., Krochmal-Marczak B., Messaoudi M., Skiba D., Pszczółkowski P., Barbaś P., Farhan A. K. (2022) Green technology as a way of cleaning the environment from petroleum substances in south-eastern Poland. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 14(4): 28
- Sharma S., Pathak H. (2014) *Pseudomonas* in biodegradation. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 2(1): 213–222
- Silva E. J., Silva I. A., Brasileiro P. P. F., Correa P. F., Almeida D. G., Rufino R. D., Luna J. M., Santos V. A., Sarubbo L. A. (2019) Treatment of oily effluent using a low-cost biosurfactant in a flotation system. *Biodegradation*, 30(4): 335–350
- Sui X., Wang X., Li Y., Ji H. (2021) Remediation of petroleum-contaminated soils with microbial and microbial combined methods: advances, mechanisms, and challenges. *Sustainability*, 13(16): 9267
- Sun S., Sidhu V., Rong Y., Zheng Y. (2018) Pesticide pollution in agricultural soils and sustainable remediation methods: a review. *Current Pollution Reports*, 4(3): 240–250
- Wang R., Wu B., Zheng J., Chen H., Rao P., Yan L., Chai F. (2020) Biodegradation of total petroleum hydrocarbons in soil: isolation and characterization of bacterial strains from oil contaminated soil. *Applied Sciences*, 10(12): 4173
- Weimer A., Kohlstedt M., Volke D. C., Nickel P. I., Wittmann C. (2020) Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(18): 7745–7766
- Wilson K. (2003) Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (Eds.) New York, Green Publishing Associates, p. 241–245
- Ye S., Zeng G., Wu H., Zhang C., Liang J., Dai J., Liu Z., Xiong W., Wan J., Xu P., Cheng M. (2017) Co-occurrence and interactions of pollutants, and their impacts on soil remediation – a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47(16): 1528–1553
- Zeng Q., Wu X., Wen X. (2016) Effects of soluble phosphate on phosphate-solubilizing characteristics and expression of *gcd* gene in *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD 2. *Current Microbiology*, 72(2): 198–206
- Zhang J.-K., Wang Z.-H., Ye Y. (2016) Heavy metal resistances and chromium removal of a novel Cr(VI)-reducing pseudomonad strain isolated from circulating cooling water of iron and steel plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(7): 1328–1344

EDN: MMPZTF

УДК 636.5.082.474:612.646

## **Lipid Peroxidation Dynamics in Chicken Embryos under Industrial Incubation Conditions with Transovarial Use of Ferulic Acid**

**Tatyana O. Azarnova, Alexandra M. Rezvykh\***,  
**Ivan I. Kochish and Inessa S. Lugovaya**  
*K. I. Scriabin Moscow State Academy  
of Veterinary Medicine and Biotechnology  
Moscow, Russian Federation*

Received 20.03.2023, received in revised form 03.11.2023, accepted 05.12.2023

**Abstract.** Research addressing lipid peroxidation in chicken embryos at different points in time is extremely important both for science and for industrial poultry farming. The negative consequences of these processes will inevitably lead to a decrease in the profitability of production. In addition, the causes and rates of free radical reactions in certain periods of embryonic development of chickens remain poorly understood. Therefore, the purpose of the current work was to study the dynamics of lipid peroxidation in chicken embryos during the main critical periods of their development under conditions of industrial incubation with the transovarial use of ferulic acid. Using the analogous pair approach, 2 batches of eggs from the Ross 308 cross broilers were selected, one of which was treated with an optimal solution (0.1 %) of ferulic acid. The antioxidant activity of blood serum was assessed using 2,6-dichlorophenolindophenol, and the concentrations of lipid peroxidation products were determined by colorimetric methods. The study showed that the rate of lipid peroxidation decreased by the end of incubation in chickens of both groups, although in the control group, it was significantly higher than in the treatment during all the days of the incubation period we studied. Thus, the concentration of Schiff bases at Days 14, 18, and 21 was higher by a factor of 2.4 ( $p < 0.05$ ), 2.3 ( $p < 0.05$ ), and 2 in the control group compared to the treatment. In addition, the antioxidant activity of blood plasma in the treatment group increased by a factor of 1.2 ( $p < 0.05$ ), 1.1, and 1.3 ( $p < 0.05$ ) at Days 14, 18, and 21, respectively, relative to the control. Thus, the study of the dynamics of the lipid peroxidation rate during chicken embryogenesis suggests that the determination of lipid peroxidation products only at Day 21 of incubation can provide sufficient data for researchers to get an idea of lipid peroxidation rate during embryogenesis

---

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: rezvyh.99@mail.ru

ORCID: 0000-0001-8760-7603 (Azarnova T.); 0000-0001-7604-1907 (Rezvykh A.); 0000-0002-8502-6052 (Kochish I.); 0000-0002-9925-7070 (Lugovaya I.)

and to predict the rate of growth and development of an individual. In addition, the transovarial use of ferulic acid makes it possible to prevent the excessive development of lipid peroxidation in the critical stages of embryogenesis.

**Keywords:** broilers, lipid peroxidation, stress, embryogenesis, ferulic acid.

Citation: Azarnova T. O., Rezvykh A. M., Kochish I. I., Lugovaya I. S. Lipid peroxidation dynamics in chicken embryos under industrial incubation conditions with transovarial use of ferulic acid. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2024, 17(1), 82–94. EDN: MMPZTF



## Особенности динамики липопероксидации у эмбрионов кур в условиях промышленной инкубации при трансовариальном использовании феруловой кислоты

Т. О. Азарнова, А. М. Резвых,  
И. И. Кочиш, И. С. Луговая

*Московская государственная академия ветеринарной медицины  
и биотехнологии им. К. И. Скрябина  
Российская Федерация, Москва*

**Аннотация.** Исследования, посвященные изучению липопероксидации в динамике у эмбрионов, крайне важны как для науки, так и для промышленного птицеводства. Негативные последствия этих процессов неизбежно приводят к снижению рентабельности производства. Помимо этого, остаются малоизученными причины и интенсивность свободнорадикальных реакций в определенные периоды эмбрионального развития цыплят. В связи с этим цель исследования – изучение особенностей динамики липопероксидации у эмбрионов кур в основные критические периоды развития в условиях промышленной инкубации при трансовариальном использовании феруловой кислоты. По принципу аналогов были подобраны 2 партии яиц от бройлеров кросса Ross 308, одну из которых обрабатывали оптимальным раствором (0,1 %) феруловой кислоты. Проводили оценку антиокислительной активности сыворотки крови с использованием 2,6-дихлорфенолиндофенола, определяли концентрации продуктов липопероксидации колориметрическими методами. Проведенные исследования показали, что интенсивность липопероксидации снижается к концу инкубации у цыплят обеих групп, при этом в контрольной группе она была значительно выше, чем в опыте, в течение всех исследуемых нами суток инкубационного периода. Так, концентрация оснований Шиффа на 14-е, 18-е и 21-е сутки превосходила в 2,4 ( $p < 0,05$ ), 2,3 ( $p < 0,05$ ) и 2 раза результаты опытной группы. Помимо этого, зафиксировано увеличение антиокислительной активности плазмы крови в опытной группе в 1,2 ( $p < 0,05$ ), 1,1 и в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ) на 14-е, 18-е и 21-е сутки соответственно относительно контроля. Таким образом, на основании полученных результатов исследования динамики интенсивности липопероксидации в эмбриогенезе кур можно утверждать, что определение продуктов ПОЛ только на 21-е сутки инкубации

может быть достаточно информативным для формирования представления об интенсивности липопероксидации в эмбриогенезе, а также для прогнозирования скорости роста и развития особи, при этом трансвариальное использование феруловой кислоты позволяет купировать избыточное развитие липопероксидации в наиболее опасные критические периоды эмбриогенеза.

**Ключевые слова:** бройлеры, перекисное окисление липидов, стресс, эмбриогенез, феруловая кислота.

---

Цитирование: Азарнова Т. О. Особенности динамики липопероксидации у эмбрионов кур в условиях промышленной инкубации при трансвариальном использовании феруловой кислоты / Т. О. Азарнова, А. М. Резвых, И. И. Кочиш, И. С. Луговая // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(1). С. 82–94. EDN: MMPZTF

---

## Введение

Исследований, посвященных изучению свободнорадикальных реакций и, как следствие, липопероксидации в динамике у эмбрионов, немного. Однако и наши работы, и работы других учёных неоднократно указывали на избыточную активизацию этих явлений при воздействии на зародыш средних и сильных факторов стресса, в частности сопряженных с условиями искусственной инкубации (Сурай, Фисинин, 2013; Азарнова и др., 2014а; Кочиш и др., 2019; Луговая и др., 2019). Особое внимание в этих исследованиях уделяли особенностям проявления и развития негативных последствий их влияния. При этом в большинстве случаев оценивали интенсивность свободно-радикальных реакций и липопероксидации у молодняка на выводе. На наш взгляд, это вполне правомерно, так как немногочисленные исследования других авторов и некоторое количество наших подтверждают, что у эмбриона эти процессы протекают особенно интенсивно, однако с некоторой тенденцией к снижению у суточного молодняка (Кучмистова, 1997; Азарнова и др., 2014б; Луговая и др., 2019). В этой связи определенный научный интерес представляет более детальное изучение и анализ их динамики в критические периоды развития, в частности сопряженные с гипоксией, неминуемо обуславливающие преумножение негативных последствий действия

налагающихся факторов стресса, связанных с условиями производства. Для наших исследований был взят один из высокопродуктивных отечественных кроссов, ведь, как известно, чем выше продуктивность птицы, тем она более чувствительна к различным воздействиям (Khan et al., 2012; Сурай, Фисинин, 2013). В этой связи рассмотрение высокочувствительного биологического объекта будет более наглядно демонстрировать изменения, происходящие в его организме.

Значимость изучения интенсивности липопероксидации в динамике высока не только для науки, но и для промышленного птицеводства. Это связано с тем, что свободно-радикальные реакции, и, как следствие, процесс липопероксидации неминуемо прогрессируют на фоне развития любого стресса вне зависимости от его этиологии. Всё это, прежде всего, обуславливает инактивацию биологически активных веществ (ферментов, гормонов и других), снижение интенсивности синтеза макроэргов, в частности в митохондриальной дыхательной цепи, при возрастающей потребности увеличения их затрат на ликвидацию последствий стресса, определяя деструктивные явления в мембранах, органеллах, клетках, тканях, органах, целом организме (Akbarian et al., 2016). Всё это нарушает становление особи, значимо снижая интенсивность развития, жизнеспособ-

способность сильных эмбрионов и обуславливает гибель слабых, определяя не только низкое качество и количество получаемого молодняка, но вместе с тем снижение рентабельности производства (Shariatmadari, 2012; Сурай, Фисинин, 2013; Азарнова и др., 2014а, 2014b; Луговая и др., 2019).

В свою очередь, изучение перекисного окисления липидов (ПОЛ) в динамике в различные периоды эмбрионального развития позволит выделить среди прочих наиболее опасные, требующие неперемного поддерживающего вмешательства этапы. Это позволит своевременно стабилизировать состояние зародыша, обеспечив условия для полноценного становления всех структур его организма, интенсивного развития и успешного вывода, создав предпосылки для благоприятного прогноза на дальнейшее существование, реализацию продуктивных качеств.

Остается малоизученным вопрос, в какие периоды эмбриогенеза и в силу каких причин ПОЛ протекает наиболее интенсивно, а когда с меньшей интенсивностью. Указанные аспекты были лишь фрагментарно обсуждены некоторыми учеными (Кучмистова, 1997). Так, в работе Е. Ф. Кучмистовой (1997) было экспериментально подтверждено стимулирующее действие ионов  $Fe^{2+}$  на прогрессию ПОЛ в печени и мозге эмбрионов птиц, а также продемонстрированы в динамике концентрации малонового диальдегида (МДА) в указанных органах у зародышей и молодняка кур. При этом отмечено, что его уровень на 21-е сутки инкубации значительно ниже, чем в предшествующие дни эмбриогенеза, а именно 12, 16, 20.

В свою очередь, в работе Е. И. Тюльковой с соавторами, посвященной исследованию одной из фундаментальных проблем нейробиологии, связанной с изучением патологических изменений деятельности мозга, вызванных

воздействием тяжелой гипоксии в пренатальном периоде развития, указано, что исследование показателей продуктов ПОЛ в динамике, в частности в виде МДА, может являться способом раннего обнаружения метаболических нарушений (Tsyul'kova et al., 2015). В их работе также продемонстрированы эффекты продолжительности действия негативных факторов, в частности гипоксии, фиксируемой в определенные периоды пренатального онтогенеза, которая, как было установлено, впоследствии индуцирует выраженную длительную активацию процессов перекисного окисления липидов в гиппокампе и неокортексе крыс на фоне снижения экспрессии пептидных антиоксидантов. Авторами отмечено, что длительно протекающая прогрессия ПОЛ и в связи с этим степень повышения уровня цитотоксичных продуктов являются отражением структурно-функциональных повреждений мембран, которые сопровождаются нарушением ферментативных и рецепторных реакций, неизбежно определяя нарушения пластичности ответа клеточных мембран (Tsyul'kova et al., 2015). Наряду с этим ими было ещё раз подтверждено высказывание Е. Ф. Кучмистовой (1997) о том, что ущерб, нанесенный эмбриону частой и длительно сохраняющейся прогрессией ПОЛ, обуславливает невосполнимый урон качеству становления различных органов, но прежде всего – мозга особи, как минимум определяя реализацию его функциональных возможностей в дальнейшем онтогенезе не в полной мере. При этом И. И. Кочишом и др. (2019) также доказано, что введение антиоксидантов в постнатальный период развития не сможет полностью ликвидировать негативные последствия аномальной интенсификации обсуждаемых процессов.

На основании указанного очевидно, что любые негативные факторы, обуславлива-

ющие избыточное образование свободных радикалов и впоследствии высокую интенсивность процессов ПОЛ в пренатальном периоде развития, имеют неминуемые последствия во взрослом организме.

Как было отмечено ранее, наибольшую прогрессию ПОЛ фиксируют в периоды одновременного воздействия нескольких стрессоров, экстремальных по силе, что в отсутствие или при недостаточности антиоксидантов способствует быстрому переходу организма в состояние истощения. Таким образом, неравномерный прогрев яиц в сетке, а также в разных зонах инкубатора, отсутствие аэроионизации и ряд других стрессоров, сопряженных с промышленной инкубацией, усугубляют тяжесть негативного влияния критических периодов развития эмбриона, фиксируемых на 4, 14 и 18–20-е сутки инкубации (Бессарабов и др., 2015).

По данным И.И. Кочиша и др. (2019), наибольшее количество факторов стресса, воздействующих на птицу в условиях производства, большинство которых экстремальные по силе, фиксируют на выводе, при этом более качественно сформированный организм имеет преимущества и в антиоксидантной защитной системе, определяя условия для более быстрого купирования избыточно развивающейся липопероксидации и её деструктивных последствий (Khan et al., 2011).

Вышеизложенное свидетельствует в пользу того, что для качественного развития зародыша особенно важно не допускать, в крайнем случае, своевременно нивелировать интенсивность заявленных негативных процессов.

В ряде исследований высокую эффективность в этом отношении доказала феруловая кислота – производное коричной кислоты, встречающееся практически у всех высших растений в составе клеточной стенки. Об-

суждаемый биостимулятор является высокоэффективной «ловушкой» свободных радикалов, тем самым способствуя терминации цепных свободнорадикальных реакций. Этот эффект характерен для феруловой кислоты благодаря ее химической структуре, а именно наличию в ней углеродной цепи, содержащей двойную связь (остаток пропеновой кислоты) и гидроксильной группы в фенильном ядре, вследствие чего она легко вступает в свободнорадикальные реакции с образованием стабильного слабо реакционноспособного феноксильного радикала (Назарова и др., 2010). Взаимодействие феноксильного радикала с гидроперекисями приводит к разрушению последних с образованием стабильных продуктов, что имеет важное значение для процессов ингибированного окисления (Pokhodenko et al., 1968). Гидроперекиси в этом случае уже не могут инициировать новые цепи окисления, а значит – феруловая кислота не способна проявлять прооксидантный эффект и с этой точки зрения имеет преимущества перед некоторыми традиционно известными антиоксидантами, например, аскорбиновой кислотой (Стасевич и др., 2014). Таким образом, этот биостимулятор способен подавлять процессы ПОЛ благодаря наличию выраженных антиоксидантных свойств, определяя условия для улучшения качественных и количественных результатов инкубации.

Известно, что исследуемое нами БАВ имеет низкий класс токсичности, обладает выраженными: противовоспалительными, антиаллергическими, антиагрегантными, противоопухолевыми, антитоксическими, гепатопротекторными, антибактериальными, противовирусными свойствами (Дьяков и др., 2005).

Таким образом, очевидно, что феруловая кислота, обладая широким спектром важных для организма свойств, может выступать в качестве эффективного средства для пода-

вления чрезмерной интенсивности процессов ПОЛ, а вместе с тем для стимуляции качественного, интенсивного эмбриогенеза особи.

В этой связи цель исследований – изучить особенности динамики липопероксидации у эмбрионов кур в основные критические периоды развития в условиях промышленной инкубации при трансвариальном использовании феруловой кислоты.

### Материалы и методы

Эксперимент был проведен в ООО «Воловский бройлер» с использованием инкубационных яиц, полученных от бройлеров кросса Ross 308. По принципу аналогов были подобраны 2 партии яиц (опытная и контрольная) по 252 штук в каждой. Первую перед закладкой в инкубатор трансвариально обрабатывали оптимальным раствором феруловой кислоты (0,1 %), выявленным в серии предшествующих экспериментов (Резвых и др., 2019; Азарнова и др., 2020; Азарнова и др., 2021); контрольная группа обработке феруловой кислотой подвержена не была. Работа была выполнена в соответствии с принципами биоэтики и правил обращения с живыми объектами (Седова, 2018).

Лабораторные исследования осуществляли на базе кафедры химии имени профессоров С.И. Афонского, А.Г. Малахова и кафедры радиобиологии и биофизики имени академика А.Д. Белова с использованием спектрофотометра СФ-26. Метод определения антиокислительной активности (АОА) сыворотки крови основан на регистрации скорости окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола (2,6-ДХФИФ) кислородом, растворенным в реакционной среде, результаты выражали в процентах (Кондрахин, 2004); концентрации продуктов ПОЛ определяли колориметрическими методами, основанными на установлении содержа-

ния продуктов ПОЛ в крови по поглощению липидным экстрактом монохроматического светового потока в ультрафиолетовой области спектра. Концентрацию МДА выражали в мкмоль/л, а оснований Шиффа (ОШ) – в относительных единицах (отн.ед./мл) (Хышиктуев и др., 1996).

Взятие крови у эмбрионов кур осуществляли на 14-е, 18-е и 21-е сутки инкубации с использованием инсулинового шприца, предварительно удалив аллантоисную жидкость из яйца для обеспечения свободного доступа к кровеносному сосуду (Садовников и др., 2009). Помимо указанных периодов, на 4-е и 8-е сутки инкубации исследовали массу эмбрионов с использованием электронных весов OHAUS Adventurer AX124/E с точностью 0,0001 г и длину эмбрионов (на 4-е сутки также большой и малый диаметры сосудистых полей), используя штангенциркуль с точностью до 0,1 см (Отрыганьев, Отрыганьева, 1982; Орлов, 1987; Прокудина и др., 2006).

Для исследования были выбраны указанные периоды, так как именно они являются наиболее опасными для эмбриона. Это критические периоды развития, связанные с:

- замедлением роста на 4-е сутки инкубации, что обусловлено накоплением молочной кислоты и аммиака, как результат усиленного использования углеводов и частично белков. Прекращается при открытии Вольфова протока в клоаку;

- задержкой роста на 14-е сутки инкубации, что связано с переходом выделительной функции от прекращающей рост первичной почки к начинающей усиленно расти постоянной;

- переходом от аллантоисного дыхания к легочному, характеризуется интенсивным использованием липидов желтка и отмечается на 18–20-е сутки (Бессарабов и др., 2015).

Также определяли основные отходы инкубации: неоплодотворенные яйца, кровяные кольца, замершие, задохлики, слабые, а также вывод цыплят – количество выведенного здорового молодняка в процентах от числа заложенных на инкубацию яиц, и выводимость яиц – количество выведенного здорового молодняка в процентах от числа оплодотворенных яиц (Бессарабов и др., 2015).

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Проведены вычисления средних арифметических и их ошибки. Разницу биохимических, физиологических и экстерьерных показателей считали достоверной при  $p < 0,05$ . Статистическую обработку данных проводили на ПК с помощью прикладных программ Microsoft Office Excel 2013.

### Результаты и обсуждение

Полученные данные указывают на факт снижения интенсивности липопероксидации к концу инкубации как у цыплят опытной, так и контрольной групп, что свидетельствует об обратной корреляции возраста зароды-

ша и его чувствительности к воздействию факторов стресса (табл. 1). Это связано с лучшим становлением антиоксидантной системы организма у более взрослых особей (Орлов, 1987; Сурай, Фисинин, 2013). Таким образом, можно утверждать, что чем старше эмбрион, тем меньше он подвержен развитию оксидативного стресса. Вышеизложенное также повышает актуальность введения биостимуляторов перед закладкой яиц в инкубатор относительно их использования в более поздние сроки, в том числе при переводе яиц из инкубаторов в выводные шкафы или в постнатальный период развития птицы. Важно упомянуть в подтверждение, что в целом ряде исследований однократная и двукратная обработки яиц дают фактически равнозначные результаты (Азарнова и др., 2013; Луговая и др., 2018; Кочиш и др., 2019).

Интенсивность липопероксидации в контрольной группе была значительно выше, чем в опыте (табл. 1). Следовательно, обработка феруловой кислотой препятствует развитию липопероксидации в каждый из критических периодов развития эмбриона. Так, концентрация МДА в контрольной группе на 14-е, 18-е

Таблица 1. Динамика интенсивности ПОЛ и АОА у эмбрионов кур, n=5

Table 1. Dynamics of LPO and AOA rates in chicken embryos, n = 5

Показатели	Возраст эмбрионов	Сутки		
		14	18	21
Контроль				
МДА, мкмоль/л		4,6±0,33	3,6±0,17	1,7±0,26
ОШ, отн.ед./мл		1,2±0,23	0,9±0,10	0,4±0,07
АОА, %		45±2,28	44±2,24	30±1,34
Опыт				
МДА, мкмоль/л		2,8±0,26**	2,1±0,24**	1,1±0,20
ОШ, отн.ед./мл		0,5±0,10*	0,4±0,07*	0,2±0,03
АОА, %		56±2,05*	47±1,26	39±2,00*

Примечание: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Различия достоверны по отношению к контролю.

и 21-е сутки превосходили показатели опытной группы в 1,6 ( $p < 0,01$ ), 1,7 ( $p < 0,01$ ), 1,5 раза соответственно, а ОШ – в 2,4 ( $p < 0,05$ ), 2,3 ( $p < 0,05$ ) и 2 раза соответственно. Это позволяет сделать вывод об эффективности применяемого БАВ, как высокодейственного стресс-протектора, замедляющего процессы ПОЛ, определяя условия для сохранения целостности мембранных структур клетки, а вместе с тем её функциональности. Помимо динамики изменения концентраций продуктов ПОЛ, было также зафиксировано увеличение АОА плазмы крови в опытной группе относительно контроля на протяжении всех изучаемых нами критических периодов развития зародышей, а именно в 1,2 ( $p < 0,05$ ), 1,1 и в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза на 14-е, 18-е и 21-е сутки соответственно. Указанное позволяет сделать предположение о стимулирующем влиянии феруловой кислоты на синтез и/или активность составляющих антиоксидантной системы организма, что является крайне важным и необходимым аспектом для развивающихся зародышей, их успешного преодоления критических периодов развития и налагающихся экстремальных по силе факторов стресса (Karadas et al., 2011).

Полученные результаты указывают, что высокий уровень продуктов ПОЛ, зафиксированный в контрольной группе на 14-е и 18-е сутки инкубации, будет наблюдаться и на 21-е сутки, следовательно, определение продуктов ПОЛ только в последний день эмбриогенеза достаточно информативно, чтобы сформировать представление об интенсивности липопероксидации в эмбриогенезе, а также для прогнозирования скорости роста и развития особи, что особенно важно в условиях производства с целью избежания прерывания производственного цикла и неоправданных финансовых затрат. Указанное согласуется с данными Е. Ф. Кучмистовой

(1997), подтверждающими, что в случае высокой интенсивности ПОЛ на протяжении всего периода инкубации концентрация цитотоксичных продуктов на 21-е сутки будет по-прежнему превышать референтные значения. Однако стоит также учитывать, что к концу эмбрионального развития интенсивность ПОЛ несколько ниже, чем в начале и середине инкубационного периода (Кучмистова, 1997). Это может быть связано с окончанием эмбрионального развития и завершением основных морфофункциональных и физиолого-биохимических перестроек организма зародышей, а также с финализацией формирования к этому времени антиоксидантной защитной системы (Орлов, 1987; Сурай, Фисинин, 2013).

Сохранение целостности и функциональности клетки определило более качественное развитие зародышей. Так, на 11-е сутки количество яиц, относящихся к первой категории по степени замыкания аллантоиса, было на 10 % больше, чем в контроле, что указывает на более быстрый выход особей из состояния предшествующей гипоксии, обуславливая снижение вероятности развития ацидоза, определяя условия для протекания реакций аэробного гликолиза, позволяющего осуществлять более полноценное (относительно анаэробного) энергообеспечение организма. Наряду с этим, по данным Б. Ф. Бессарабова и др. (2015), своевременное замыкание аллантоиса также способствует поступлению белка к эмбриону, при этом, покрывая белок, он предохраняет его от испарений воды, запасы которой к этому периоду значимо сокращены. Очевидно, именно этот факт обусловил уменьшение «усушки» яиц за 18 дней инкубации, величина которой составила в опыте 13 % против 14 % в контроле. Тем же автором установлено, что в случае, если аллантоис замыкается на 11-е

сутки инкубации кур полностью, минеральные вещества скорлупы, в первую очередь необходимые для качественного построения костяка, начинают использоваться эмбрионом быстрее (Бессарабов и др., 2015). Последнее подтверждено исследованиями толщины скорлупы яиц на выводе (в опытной группе она уступала контролю на 2,94 %), что наряду с указанным выше создает предпосылки для своевременного вывода, упрощая выход цыпленка из яйца (табл. 2).

Более тонкая скорлупа и более высокая на всех этапах развития жизнеспособность

зародышей опытной группы определили повышение вывода цыплят и выводимости яиц на 5,56 % ( $p < 0,05$ ) и на 3,07 % соответственно по сравнению с контролем (табл. 2).

Следует отметить, что эмбрионы были не только более жизнеспособными и качественно развитыми, но росли интенсивнее, в том числе в основные критические периоды эмбриогенеза, значимо опережая представителей контрольной группы (табл. 3). Опытная партия на 4-е сутки достоверно превосходила контроль по следующим показателям: малому диаметру сосудистого поля на 13,64 %

Таблица 2. Некоторые показатели биоконтроля инкубации, %, n = 252

Table 2. Some parameters of incubation biocontrol, %, n = 252

Группа	Неоплодотворенные	Кровяные кольца	Замершие	Задох-лики	Слабые	Вывод цыплят	$\pm\Delta$	Выводимость яиц	$\pm\Delta$
Контроль	5,95± 1,49	0	3,97± 1,23	2,38± 0,96	0,40± 0,40	87,30± 2,10	-	92,83± 1,63	-
Опыт	3,17± 1,10	0	2,38± 0,96	1,59± 0,79	0	92,86± 1,62*	+5,56	95,90± 1,25	+3,07

Примечание: \*  $p < 0,05$ .

Таблица 3. Рост и развитие эмбрионов, n=5

Table 3. Growth and development of embryos, n = 5

Сутки инкубации	Показатель	Контроль	Опыт
4-е	Большой диаметр сосудистого поля, см	3,2±0,05	3,4±0,06
	Малый диаметр сосудистого поля, см	2,2±0,02	2,5±0,02***
	Длина, мм	15,0±0,32	16,6±0,24***
	Кол-во сосудов, идущих от эмбриона, шт.	6,5±0,22	7,8±0,23*
	Масса, г	0,018±0,007	0,021±0,008**
8-е	Длина, мм	27,2±0,37	28,6±0,24*
	Масса, г	1,57±0,02	1,66±0,02*
14-е	Длина, мм	84,8±0,97	87,8±0,73
	Масса, г	11,3±0,17	11,7±0,13
18-е	Длина, мм	141±0,95	144±1,10
	Масса, г	24,3±0,90	25,7±0,71
21-е	Длина, мм	196±1,59	210±1,33***
	Масса, г	44,2±1,32	47,4±0,24

Примечание: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

( $p < 0,001$ ), длине на 10,67 % ( $p < 0,001$ ), количеству сосудов, идущих от эмбриона, в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ) и массе в 1,2 раза ( $p < 0,01$ ) (табл. 3). В последующие дни инкубации также была зафиксирована тенденция к превосходству опытной группы относительно контроля по длине и массе эмбрионов: на 8-е сутки на 5,15 % ( $p < 0,05$ ) и на 5,73 % ( $p < 0,05$ ), на 14-е сутки равнозначно на 3,54 %, на 18-е сутки на 2,13 % и на 5,76 % и на 21-е сутки на 7,14 % ( $p < 0,001$ ) и на 7,24 % соответственно.

Анализ совокупности вышепредставленных данных позволяет считать, что интенсивность липопероксидации в контрольной группе является избыточной, и её угнетение – важная задача птицеводства для повышения результативности инкубации.

### Заключение

Интенсивность липопероксидации в основные критические периоды эмбриональ-

ного развития имеет тенденцию к снижению к моменту вылупления молодняка при одновременном повышении антиоксидантной защиты, что, очевидно, связано с лучшим ее становлением у более возрастных особей. Во избежание неоправданных финансовых затрат в условиях дефицита реактивов определение продуктов ПОЛ возможно только на 21-е сутки инкубации, что достаточно информативно для формирования представления об интенсивности липопероксидации в эмбриогенезе, а также для прогнозирования благополучия особи по скорости роста и качеству развития. Прединкубационное трансвариальное использование феруловой кислоты позволяет купировать избыточное развитие липопероксидации в наиболее опасные критические периоды эмбриогенеза, создавая условия для более качественного, интенсивного развития и повышения жизнеспособности молодняка.

### Список литературы / References

Азарнова Т. О., Ярцева И. С., Индюхова Е. Н., Зайцев С. Ю., Найденский М. С., Антипов А. А., Веротченко М. А. (2013) Метаболизм костной ткани суточных цыплят при сочетанном использовании некоторых естественных метаболитов. *Аграрная Россия*, 12: 33–36 [Azarnova T. O., Yartseva I. S., Induykhova E. N., Zaitsev S. Yu., Naydenskiy M. S., Antipov A. A., Verotchenko M. A. (2013) Bone metabolism in chicks with concomitant use of some natural metabolites. *Agrarian Russia* [Agrarnaya Rossiya], 12: 33–36 (in Russian)]

Азарнова Т. О., Болгова М. И., Индюхова Е. Н., Зайцев С. Ю., Найденский М. С., Киселев А. Л., Антипов А. А. (2014а) Использование хондропротекторов в промышленной инкубации яиц. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*, 4: 18–19 [Azarnova T. O., Bolgova M. I., Induykhova E. N., Zaitsev S. Yu., Naydenskiy M. S., Kiselev A. L., Antipov A. A. (2014a) Use of chondroprotective preparation in industrial incubation of eggs. *Russian Veterinary Journal. Productive Animals* [Rossiiskii veterinarnyi zhurnal. Sel'skokhozyaistvennyye zhivotnyye], 4: 18–19 (in Russian)]

Азарнова Т. О., Максимов В. И., Индюхова Е. Н., Зайцев С. Ю. (2014b) Влияние йодсодержащего препарата при обработке in ovo на качество цыплят суточного возраста. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*, 4: 24–26 [Azarnova T. O., Maximov V. I., Induykhova E. N., Zaitsev S. Yu. (2014b) Influence of iodinecontaining drug in the in ovo treatment on the quality of dayold chicks. *Russian Veterinary Journal. Productive Animals* [Rossiiskii veterinarnyi zhurnal. Sel'skokhozyaistvennyye zhivotnyye], 4: 24–26 (in Russian)]

Азарнова Т. О., Резвых А. М., Найденский М. С. (2020) Антигипоксический эффект феруловой кислоты в промышленной инкубации яиц. *Аграрная Россия*, 1: 17–20 [Azarnova T. O., Rezvykh A. M., Naidenskiy M. S. (2020) Antihypoxic effect of ferulic acid in industrial egg incubation. *Agrarian Russia* [Agrarnaya Rossiya], 1: 17–20 (in Russian)]

Азарнова Т. О., Резвых А. М., Максимов В. И., Найденский М. С., Кочиш И. И., Луговая И. С., Садовская Т. А., Аншаков Д. В., Золотухина Е. А. (2021) Способ нивелирования гипоксии у эмбрионов кур. Патент № 2751848 [Azarnova T. O., Rezvykh A. M., Maksimov V. I., Najdenskiy M. S., Kochish I. I., Lugovaya I. S., Sadvovskaya T. A., Anshakov D. V., Zolotukhina E. A. (2021) *Method for alleviating hypoxia in chicken embryos*. Patent № 2751848 (in Russian)]

Бессарабов Б. Ф., Крыканов А. А., Киселев А. Л. (2015) Инкубация яиц сельскохозяйственной птицы. Санкт-Петербург, Лань, 160 с. [Bessarabov B. F., Krykanov A. A., Kiselev A. L. (2015) *Incubation of poultry eggs*. St. Petersburg, Lan', 160 p. (in Russian)]

Дьяков А. А., Перфилова В. Н., Тюренков И. Н. (2005) Противоаритмическое действие феруловой кислоты. *Вестник аритмологии*, 39: 49–52 [Dyakov A. A., Perfilova V. N., Tyurenkov I. N. (2005) Antiarhythmic action of ferulic acid. *Journal of Arrhythmology* [Vestnik aritmologii], 39: 49–52 (in Russian)]

Кондрахин И. П. (ред.) (2004) Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник. Москва, КолосС, 520 с. [Kondrakhin I. P. (Ed.) (2004) *Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics: a handbook*. Moscow, KolosS, 520 p. (in Russian)]

Кочиш И. И., Азарнова Т. О., Найденский М. С. (2019) Профилактика свободнорадикальных аномалий у кур в раннем онтогенезе. Москва, Сельскохозяйственные технологии, 358 с. [Kochish I. I., Azarnova T. O., Naidenskiy M. S. (2019) *Prevention of free radical anomalies in chickens in early ontogeny*. Moscow, Agricultural technologies, 358 p. (in Russian)]

Кучмистова Е. Ф. (1997) Особенности перекисного окисления липидов в эмбриональных тканях различных видов сельскохозяйственной птицы. *Информационный листок ХАРПНТЭИ*, 90–97: 1–3 [Kuchmistova E. F. (1997) Features of lipid peroxidation in embryonic tissues of various poultry species. *Information Sheet of the Kharkov Enterprise of Scientific, Technical, and Economic Information* [Informatsionnyi listok KHARPNT EI], 90–97: 1–3 (in Russian)]

Луговая И. С., Азарнова Т. О., Кочиш И. И., Найденский М. С., Зайцев С. Ю. (2018) Управление процессами перекисного окисления липидов комбинацией БАВ в эмбриогенезе кур. *Птица и птицепродукты*, 5: 56–58 [Lugovaya I. S., Azarnova T. O., Kochish I. I., Naidenskiy M. S., Zaitsev S. Yu. (2018) Managing processes of lipid peroxidation with BAS combination in hen embryogenesis. *Poultry & Chicken Products* [Ptitsa i ptitseprodukty], 5: 56–58 (in Russian)]

Луговая И. С., Азарнова Т. О., Кочиш И. И., Найденский М. С., Зайцев С. Ю. (2019) Влияние естественных метаболитов на зоотехнические показатели цыплят. *Птица и птицепродукты*, 2: 65–67 [Lugovaya I. S., Azarnova T. O., Kochish I. I., Naidenskiy M. S., Zaitsev S. Yu. (2019) The effect of natural metabolites on some zootechnical indicators of chickens. *Poultry & Chicken Products* [Ptitsa i ptitseprodukty], 2: 65–67 (in Russian)]

Назарова Л. Е., Оганова М. А., Абисалова И. Л. (2010) Активность кислоты феруловой в условиях цитотоксического повреждения. Пятигорск, Рекламно-информационное агентство на КМВ, 115 с. [Nazarova L. E., Oganova M. A., Abisalova I. L. (2010) *Activity of ferulic acid under conditions of cytotoxic damage*. Pyatigorsk, Advertising and Information Agency in the Caucasian Mineral Waters, 115 p. (in Russian)]

Орлов М. В. (1987) *Биологический контроль в инкубации*. Москва, Россельхозиздат, 223 с. [Orlov M. V. (1987) *Biological control in incubation*. Moscow, Rossel'hozizdat, 223 p. (in Russian)]

Отрыганьев Г. К., Отрыганьева А. Ф. (1982) *Технология инкубации*. Москва, Россельхозиздат, 142 с. [Otryganiev G. K., Otryganieva A. F. (1982) *Incubation technology*. Moscow, Rossel'hozizdat, 142 p. (in Russian)]

Прокудина Н. А., Артеменко А. Б., Огурцова Н. С. (2006) *Методы биологического контроля в инкубации*. Борки, Институт птицеводства УААН, 108 с. [Prokudina N. A., Artemenko A. B., Ogurtsova N. S. (2006) *Methods of biological control in incubation*. Borki, Institute of Poultry of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, 108 p. (in Russian)]

Резвых А. М., Азарнова Т. О., Найденский М. С., Луговая И. С., Остренко К. С. (2019) Реализация антиоксидантных и обменостимулирующих свойств феруловой кислоты для нивелирования гипоксии у эмбрионов кур. *Сборник тезисов VI Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов*. Новосибирск, ИПЦ НГУ, с. 591–594 [Rezvykh A. M., Azarnova T. O., Naidenskiy M. S., Lygovaya I. S., Ostrenko K. S. (2019) Realization of antioxidant and exchange-propertiing properties of ferulic acid for leveling hypoxia in chicken embryos. *Collection of Abstracts of the VI International Conference of Young Scientists: Biophysicists, Biotechnologists, Molecular Biologists and Virologists*. Novosibirsk, Publishing and Printing Center of Novosibirsk State University, p. 591–594 (in Russian)]

Садовников Н. В., Придыбайло Н. Д., Верешак Н. А., Заслонов А. С. (2009) *Общие и специальные методы исследования крови птиц промышленных кроссов*. Екатеринбург, Санкт-Петербург, Уральская ГСХА, 86 с. [Sadovnikov N. V., Prydybailo N. D., Vereshchak N. A., Zaslunov A. S. (2009) *General and special methods for the study of the blood of birds of industrial crosses*. Yekaterinburg, St. Petersburg, Ural State Agricultural Academy, 86 p. (in Russian)]

Седова Н. Н. (2018) *Биоэтика: учебник для вузов*. Москва, КНОРУС, 215 с. [Sedova N. N. (2018) *Bioethics: a textbook for universities*. Moscow, KNORUS, 215 p. (in Russian)]

Стаевич О. В., Лихтарович Е. С., Шемет С. Н. (2014) Анализ феруловой кислоты в растениях, содержащих фенилпропаноиды. *Труды БГТУ. № 4. Химия, технология органических веществ и биотехнология*, 4: 200–203 [Stasevich O. V., Likhtarovich E. S., Shemet S. N. (2014) Analysis of ferulic acid in plants containing phenylpropanoids. *Proceedings of BSTU. No. 4. Chemistry, Organic Substances Technology and Biotechnology* [Trudy BGTU. № 4. Khimiya, tekhnologiya organicheskikh veshchestv i biotekhnologiya], 4: 200–203 (in Russian)]

Сурай П., Фисинин В. И. (2013) Природные антиоксиданты в эмбриогенезе кур и защита от стрессов в постнатальном развитии (обзор). *Сельскохозяйственная биология*, 48(2): 3–18 [Surai P., Fisinin V. I. (2013) Natural antioxidants in hens' embryogenesis and antistress defence in postnatal development (review). *Agricultural Biology* [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya], 48(2): 3–18 (in Russian)]

Хышиктеуев Б. С., Хышиктеуева Н. А., Иванов В. Н. (1996) Методы определения продуктов перекисного окисления липидов в конденсате выдыхаемого воздуха и их клиническое значение. *Клиническая лабораторная диагностика*, 3: 13–15 [Khyshiktuev B. S., Khyshiktueva N. A., Ivanov V. N. (1996) Methods for determination of lipid peroxidation products in exhaled air condensate and their clinical significance. *Clinical Laboratory Diagnostics* [Klinicheskaya laboratornaya diagnostika], 3: 13–15 (in Russian)]

Akbarian A., Michiels J., Degroote J., Majdeddin M., Golian A., De Smet S. (2016) Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7: 37

Karadas F., Surai P.F., Sparks N.H. (2011) Changes in broiler chick tissue concentrations of lipid-soluble antioxidants immediately post-hatch. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 160(1): 68–71

Khan R.U., Naz S., Nikousefat Z., Tufarelli V., Javdani M., Rana N., Laudadio V. (2011) Effect of vitamin E in heat-stressed poultry. *World's Poultry Science Journal*, 67(3): 469–478

Khan R.U., Rahman Z.U., Nikousefat Z., Javdani M., Tufarelli V., Dario C., Selvaggi M., Laudadio V. (2012) Immunomodulating effects of vitamin E in broilers. *World's Poultry Science Journal*, 68(1): 31–40

Pokhodenko V.D., Khizhnyi V.A., Bidzilya V.A. (1968) Stable phenoxy-radicals. *Russian Chemical Reviews*, 37(6): 435–448

Shariatmadari F. (2012) Plans of feeding broiler chickens. *World's Poultry Science Journal*, 68(1): 21–30

Tyul'kova E. I., Kislin M. S., Vataeva L. A. (2015) The effects of prenatal hypobaric hypoxia on the level of lipid peroxidation in the neocortex and hippocampus of rats. *Neurochemical Journal*, 9(1): 54–59

EDN: KSFNKQ

УДК 591.5: 599.735.31

## Formation of the Behavior in Domesticated Moose (*Alces alces* L., 1758) during the First Two Years of Life

Olga N. Sitnikova<sup>\*a, b, c</sup>,  
Vitaliy A. Zaitsev<sup>d</sup> and Marina V. Sirotina<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup>*Kostroma State University  
Kostroma, Russian Federation*

<sup>b</sup>*Kostroma Scientific Research Institute of Agriculture  
Minskoye village, Russian Federation*

<sup>c</sup>*M.G. Sinitsyn State Natural Reserve “Kologrivsky Les”  
Kologriv, Russian Federation*

<sup>d</sup>*A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution Problems  
of the Russian Academy of Science  
Moscow, Russian Federation*

Received 14.01.2022, received in revised form 19.11.2023, accepted 15.03.2024

**Abstract.** The study of the moose behavior ontogeny under semi-free-range conditions makes it possible to fill in the missing information on the issues of interest for researchers and moose breeders and to estimate the possibility of managing the grouping of moose in farms. The purpose of the present study was to characterize the development of behaviors – feeding, defensive, and social ones – in moose calves up to two years of age, kept without mothers, in the Kostroma Moose Farm. In addition, the behavior of farm moose was compared with the behavior of the moose in the wild. The methods included visual observations with photo and video recording, timing of moose actions, and data processing in Statistica, NextQGIS, and MapInfo programs. All behaviors of moose calves developed together with the coordination of movements, initially in the form of innate imitative reactions with further substitution, expansion of functions, and arrangement into patterns. The main pattern of feeding behavior – “rumination” – developed in parallel with the sucking and was fully formed in moose calves by the age of two months. The formation of other behavioral patterns (social, sexual behaviors) lasted from 2–2.5 months to two or more years. The ratio of defensive behavioral patterns changed with age. Social integration based on instincts and imprinting of conspecifics and the moose breeder started from the first hours of life.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

\* Corresponding author E-mail address: sitnikova.olga1989@yandex.ru

ORCID: 0000-0002-4861-6141 (Sitnikova O.); 0000-0003-0953-7309 (Zaitsev V.); 0000-0002-7840-8861 (Sirotina M.)

Moose calves from different mothers were kept in a common large group. Animals showed affection to each other based on kindred, friendship, and individual preferences. The most stable subgroups were those of blood relatives, which were similar to groups of moose calves with mothers in the wild. The play hierarchy developed from the first months of life and led to a stable ranking in the general group, which gradually disintegrated by the age of 1.5 years. Moose, however, maintained distant associations with synchronous behavior. By the age of two years, the properties of the social organization of the moose in the farm had approached those of a wild population.

**Keywords:** moose calves (*Alces alces*), Kostroma Moose Farm, ontogeny of behavior, behavior types, patterns, social behavior, social hierarchy, group formation, wild moose population.

**Acknowledgments.** The authors are grateful to all employees and the management of the Sumarokovskaya Moose Farm for their assistance in research. We express our special gratitude to N. V. Sokolov for valuable advice and data.

---

Citation: Sitnikova O.N., Zaitsev V.A., Sirotnina M.V. Formation of the behavior in domesticated moose (*Alces alces* L., 1758) during the first two years of life. *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2024, 17(1), 95–114. EDN: KSFNKQ

---

## **Формирование поведения одомашниваемых лосей (*Alces alces* L., 1758) до двух лет жизни**

**О. Н. Ситникова<sup>а, б, в</sup>, В. А. Зайцев<sup>г</sup>, М. В. Сиротина<sup>а, в</sup>**

<sup>а</sup>*Костромской государственной университет  
Российская Федерация, Кострома*

<sup>б</sup>*Костромской научно-исследовательский институт  
сельского хозяйства  
Российская Федерация, село Минское*

<sup>в</sup>*Государственный природный заповедник «Кологривский лес»  
им. М. Г. Синицына  
Российская Федерация, Кологрив*

<sup>г</sup>*Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова  
Российская Федерация, Москва*

---

**Аннотация.** Изучение онтогенеза поведения лося при полувольном содержании позволяет восполнить недостающие сведения по интересующим исследователей и лосеводов проблемам, определить возможность управления группировкой лосей на фермах. Цель сообщения заключается в характеристике развития активностей поведения: пищевого, оборонительного, социального у лосят до двух лет жизни, содержащихся без матерей, на Костромской лосеферме. Мы сравниваем также поведение фермерских лосей с поведением лосей в природе. Методика включала визуальные наблюдения с фото- и видеосъемкой, хронометраж действий лосей, обработку данных в программах Statistica, NextQGIS, MapInfo. Все активности поведения развиваются

вместе с координацией движения, проявляясь вначале в качестве врожденных имитационных и своеобразных переадресованных реакций с дальнейшим замещением, расширением или ограничением их функций, формируя соответствующие паттерны. Основной паттерн пищевого поведения – «жвачка» – развивался параллельно с сосанием и полностью формировался к двум месяцам жизни лосят. Становление паттернов других активностей растягивается от 2–2,5 месяцев до двух и более лет (социального, сексуального поведения). Меняется соотношение паттернов оборонительного поведения. Социальная интеграция на основе инстинктов, импринтинга конспецификов, а также лосевода начинается с первых часов жизни. Лосят от разных лосих содержат в общей большой группе. Они выявляют привязанность друг к другу по родственным, дружеским отношениям, индивидуальным предпочтениям. Наиболее устойчивы подгруппы родственников, которые аналогичны группам лосят-родственников с лосихами в дикой природе. Игровая иерархия развивалась с первых месяцев жизни и привела к устойчивому порядку рангов в общей группе, постепенно распавшейся к 1,5 годам жизни лосят. Тем не менее лоси поддерживали дистантные ассоциации с синхронностью поведения. К двум годам жизни социальная организации лосей на ферме приобретала все больше свойств дикой популяции.

**Ключевые слова:** лосята (*Alces alces*), Костромская лосеферма, онтогенез поведения, активности поведения, паттерны, социальное поведение, социальная иерархия, формирование групп.

**Благодарности.** Авторы благодарят всех сотрудников и администрацию Сумароковской лосиной фермы за содействие в исследованиях. Особую признательность выражаем Н. В. Соколову за ценные советы и некоторые данные.

Цитирование: Ситникова О.Н. Формирование поведения одомашниваемых лосей (*Alces alces* L., 1758) до двух лет жизни / О.Н. Ситникова, В.А. Зайцев, М.В. Сиротина // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2024. 17(1). С. 95–114. EDN: KSFNKK

## Введение

Исследование онтогенеза поведения представляет собой значительный интерес для обоснования биологических основ управления популяциями животных, одомашнивания некоторых их видов. Это относится и к лосю в связи с экспериментами по одомашниванию в России (Кнорре, 1969, 1973; Кожухов, 1973; Bogomolova et al., 2002; Соколов, 2012; и др.), Канаде (Renecker et al., 1987; Шварц, 1990), Польше (Krzywinski et al., 1987) и других странах. Лосеводы вынуждены учитывать присущее виду поведение, свойства популяции, оценивать перспективы их модификации согласно условиям содержания.

Содержание животных в вольерах расширяет возможность исследования онтогенеза. В публикациях, характеризующих развитие поведения лося (Altmann, 1958; Кнорре, 1959, 1961; Кожухов, 1965; Markgren, 1966; Stringham, 1971, 1974; Баскин, 1978; Богомолова, Курочкин, 1980, 1984; Bogomolova et al., 2002; и др.), приводится описание тех или иных особенностей поведения преимущественно до года жизни лосят. В статье Л. К. Смирениной с соавт. (1983) характеризуется игровое и агрессивное поведение лосят возраста от 10 до 20 месяцев на лосеферме. Выделяется работа Седерлунд (Cederlund, 1987), в которой дано систематизированное описание поведения лосят-сеголетков

в загоне, и А. Н. Минаева (1992), проводившего биотелеметрические исследования на Костромской лосеферме. В настоящее время наименее известно о становлении социальных и пространственных связей между особями, кроме материнско-детских отношений и сопутствующего им поведения. Между тем изучение развития социального поведения, формирования групп в аспекте присущего лосю индивидуально-группового образа жизни, позволяет восполнить множество недостающих сведений по интересующим исследователей и лосеводов проблемам.

Задача данного сообщения состоит в характеристике формирования основных активностей поведения лосят до двух лет жизни с количественной оценкой проявлений реакций и паттернов на разных этапах онтогенеза. Мы сопоставляли полученные результаты с известными данными, главным образом по работам Седерлунд (Cederlund, 1987) и А. Н. Минаева (1992). Особое внимание уделено развитию социального поведения, формированию особями объединений. Проводятся аналогии с некоторыми известными свойствами поведения и структуры популяции диких лосей, что, вероятно, позволит определить пути и возможности дальнейшего одомашнивания вида.

#### **Материал и методика исследования**

Исследования проведены в государственном природном заказнике «Сумароковский» (36176 га), на Костромской лосиной ферме, созданной в 1963 г. в Костромской области. Данная территория приурочена к подзоне южной тайги с преобладанием ельников разных стадий возрастной сукцессии, березняков и осинников. В основные задачи деятельности лосефермы входит: а) получение продукции, прежде всего молока; б) селекционная работа, направленная на создание

продуктивного и управляемого поголовья лосей. Данные работы столкнулись со многими трудностями, что стимулировало исследование биологии вида, поведения, возможностей воспитания, генетических основ одомашнивания (Готовцев, 1983; Баскин, 1986; Минаев, 1992; Bogomolova et al., 2002; Соколов, 2012; Соколов и др., 2015; и др.). Наиболее целесообразным признано полувольное содержание лосей. Зимой всех лосей, среди взрослых особей в основном самок (что обусловлено задачами фермы), содержат в загоне – «зимнем лагере». Широкие проемы в ограде позволяют лосям свободно выходить в окружающий лес и входить обратно. В теплый сезон большая часть лосей содержится на свободном выпасе в лесу.

В 2018–2020 гг. мы изучали поведение восьми лосят, рожденных в конце апреля – начале мая 2018 г. от четырех одомашниваемых лосих (табл. 1). В период от двух часов до двух суток после рождения лосят отделяли от матерей и содержали общей группой в небольших боксах. В результате импринтинга лосята с раннего возраста ориентировались как на ухаживающего за ними человека, так и на группу особей своего возраста. Через месяц лосят выпускали в прилегающий загон, в котором в течение следующих 4 месяцев их содержали обособленной группой от других лосей, а на ночь уводили за пределы ограды лосефермы для пастбы. В снежный же период (ноябрь–февраль) в оба года исследований лосей всех возрастов уводили в специализированный загон, так называемый зимний лагерь. Затем в теплое время лосят возрастом 1–1,5 лет содержали обособленно от других возрастных групп лосей в определенном загоне площадью 5 га, куда им привозили ветви ивы, траву, подкармливали овсяной кашей. Из восьми лосят-сеголетков, рожденных в 2018 г., с мая по август 2019 года уже наблю-

Таблица 1. Исследуемые лосята 2018 г. рождения

Table 1. The studied moose calves born in 2018

Кличка лосихи	Кличка лосенка	Пол лосенка	Масса при рождении, кг
Навзикая	Навал	Самец	13,0
	Нелдай	Самец	13,2
Василиса	Весна	Самка	13,0
	Ветра	Самка	12,8
Язалия	Яндера	Самка	13,8
	Ястера	Самка	12,3
Наоми	Натуся	Самка	10,2
	Нанами	Самка	8,2

дали за четырьмя особями, так как четырех лосят продали на другие фермы (в апреле 2019 года).

Поведение лосят изучали внутри двух возрастных классов: сеголетки – класс (0–1) года, особи второго года жизни – (1–2) года или 1,5-годовалые. В статье использованы результаты более 1350 ч наблюдений за лосятами в разные сезоны года. В течение 13 суток в разные периоды регистрировали активность лосят, определяли время, затраченное на пищевое и другое поведение. Агонистическое и оборонительное поведение лосят-сеголетков подробно изучали в мае-августе 2018 г. в течение 38 суток (общее время наблюдений – 28,4 ч), лосят второго года жизни – в мае-августе 2019 г. в течение 24 суток (18 ч). Акты игрового и агрессивного поведения регистрировали в течение 309 ч.

Поведение лосей описывали, хронометрировали, применяли фото- и видеосъемку. В зависимости от задач единицами записи служили как отдельные акты поведения (действия, реакции) в их континууме, так и их блоки – паттерны (“pattern”). Скотт и Фуллер (Scott, Fuller, 1965, с. 59) определяют паттерн, как «...уникальную и независимую часть поведения, имеющую полную адаптивную функцию». Разные паттерны могут иметь

разный состав и структуру. Выделение паттернов («жвачка», «сосание», «затаивание» и др.) удобно в методическом аспекте, так как позволяет компоновать последовательность промежуточных действий, приводящих к конечному результату.

Для оценки социальных контактов между особями использовали специальные формы записи. Затем определяли среднее число актов поведения за период исследований, в среднем за час. Расчет баланса времени для пищевого поведения проводили как соотношение количества минут, потраченных на определенный паттерн за сутки или за общее время изучения.

Для характеристики поведения лосей использовали известное представление об активностях поведения: оборонительного, пищевого, социального и др. Игровое поведение по исполнению и мотивации выделяли в особую категорию, включающую многие акты другого поведения, прежде всего оборонительного, агонистического, но в ослабленной форме, например, без сильных ударов ногами или покусываний, двигательной активности. Седерлунд (Cederlund, 1987) относит к результатам игровых и агонистических контактов распад группы. Для других видов (например, кабана – *Sus scrofa* L.) показано, что игры

и агрессивные действия способствуют формированию двух линий иерархии, а также разных ассоциаций, групп и подгрупп особей (Зайцев, 1995).

Сплоченной группой считали объединение особей, придерживающихся небольших расстояний друг от друга со значительной синхронностью перемещений и поведения, и отделенной от других подобных групп или особей большими дистанциями. Группы диких лосей на небольших дистанциях между особями обычно не превышают 18 особей (Pulliainen, 1974; Филонов, 1983; Баскин, 1984; Baskin, 1994; Данилкин, 1999; Глушков, 2001; Смирнов, 2014). Подобные большие объединения чаще встречаются в периоды миграций, протяженных перемещений (далее 15–20 км). Состав животных в небольших сплоченных группах может быть разным. В лесу Ярославской и Костромской областей встречались группы разного состава: самцов, самок с лосятами и без них, смешанные группы из особей разного пола, возраста, в период гона и в другое время. Большие сплоченные группы лосей нередко рассредоточиваются на более мелкие группы и одиночки, лоси частично синхронизируют свои перемещения, формируя дистантные ассоциации (Зайцев, 1994, 2000).

«Лидером» группы считали особь, действия которой постоянно или в течение определенного времени привлекают других особей, подражающих ей. Лидер обычно определяет направление и скорость движения, место и время кормежки, отдыха и другую деятельность группы. Иерархическое положение особи в группе устанавливали по используемым актам агрессии, результатам конфликтов, в том числе таким, как «вытеснение» одного лосенка другим с места у кормушки без явной агрессии. Бывает достаточно несколько стычек, после которых один из соперников избегал конфликтов с другим.

При обработке и анализе количественных данных использовали программы MS Excel, Statistica 8 и 10, данных распределения лосей в пространстве – NextQGIS, MapInfo 7.2. В тексте использованы обозначения:  $SD$  – среднее квадратичное отклонение;  $CV$  – коэффициент вариации, %;  $\chi^2$  – хи-квадрат;  $r^2$  – коэффициент детерминации для линейной регрессии;  $r_s$  – коэффициент корреляции Спирмена. Сравнение выборок обычно проведено по критерию *WM-test* – Wilcoxon Matched Pairs Test (после теста Колмогорова-Смирнова – *KS*) для зависимых выборок. *WM-test* применяли для сравнения действий одних и тех же особей в разное время.

## Результаты и обсуждение

### *Поведение лосят в возрасте до года*

Реакции, присущие паттернам пищевого поведения, либо предопределяли развитие реакций другого паттерна, либо сочетались с другим актом по мере взросления лосенка и возможности использования разной пищи (рис. 1). В первые часы жизни лосенка наблюдается причмокивание (поступательные движения нижней челюсти в отсутствие пищевых объектов), которое сопровождалось обследованием, поиском сосков матери в первой фазе развития поведения, во второй фазе: облизывание морды, обнюхивание соска и сосание (табл. 2). В первую неделю жизни отмечали также боковые движения челюстей – врожденные движения, которые происходят до того, как возникает возможность жевания, так как во рту лосенка на этой стадии отсутствуют посторонние твердые объекты, покусывание – движения челюстей, направленные на какой-либо объект. Подобные акты, характеризующие «оральный автоматизм» (Джурович и др., 1984), отмечены также Седерлунд (Cederlund, 1987), Л.М. Баскиным (1978), А.Н. Минаевым (2003).

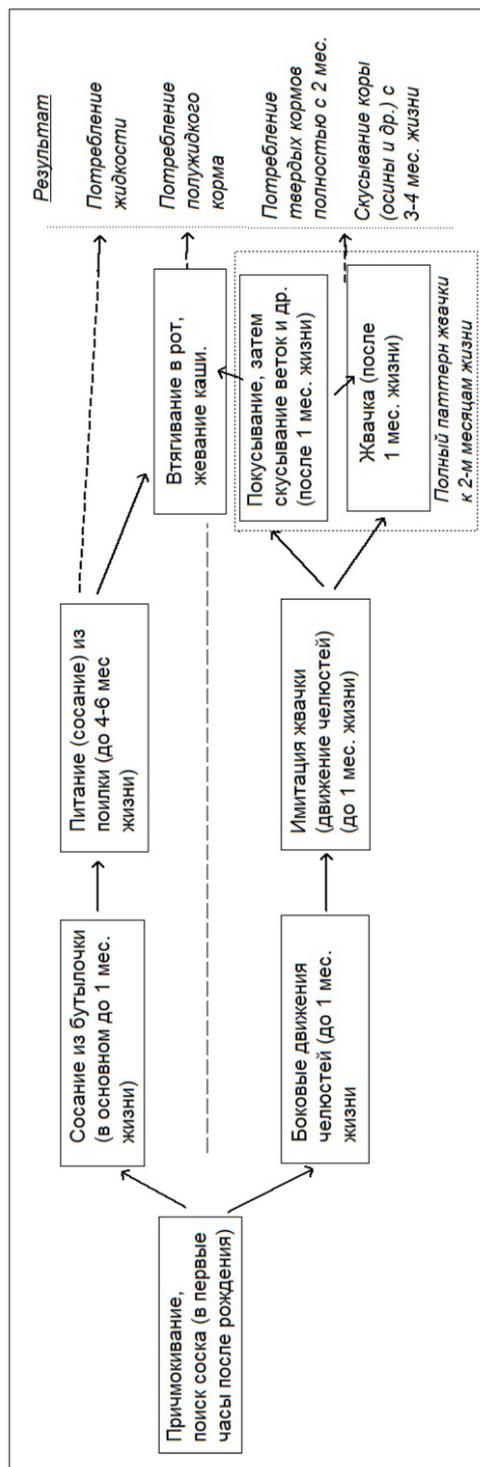


Рис. 1. Схема развития паттернов пищевого поведения лосят-сеголетков, содержащихся без матерей

Fig. 1. A schematic showing development of feeding behavior patterns in moose calves-under-yearlings kept without mothers

Таблица 2. Число актов (за час; в скобках – стандартное отклонение *SD*) нескольких активностей поведения, регистрируемое у лосят-сеголетков в мае-августе 2018 г. при содержании в загонеTable 2. The number of acts (per hour; in brackets – standard deviation *SD*) of several behaviors recorded in moose calves-under-yearlings kept in a pen during May -August 2018

Активности поведения	Элементы поведения (раз/час)	Лосята и нумерация их рангов иерархии							
		Навал	Нелдай	Весна	Ветра	Яндера	Ястера	Натуся	Нанами
		1	2	3	4	5	6	7	8
Пищевое	Причмокивание (за первые 24 ч жизни)	0,5	0,38	0,58	0,54	-	-	-	0,25
	Боковые движения челюстями	0,38	0,42	0,50	0,67	0,46	0,29	0,13	0,13
	Сосание из соски (до 1 мес. жизни)	0,23	0,29	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,29
Социальная, агонистическое поведение	Направленный удар передними копытами	0,07 (0,30)	0,04 (0,22)	0	0,03 (0,18)	0	0	0	0
	Ненаправленный удар передними копытами	0,03 (0,16)	0,04 (0,22)	0	0	0,07 (0,30)	0	0	0,03 (0,16)
	Направленный удар задними копытами	0,07 (0,30)	0,07 (0,31)	0	0	0	0	0	0
	Ненаправленный удар задними копытами	0,03 (0,16)	0	0,06 (0,30)	0,03 (0,16)	0	0	0	0
	Кусание партнера	0,04	0,04	-	-	-	0,08	-	-
	Преследование партнера бегом	0,07 (0,30)	0,03 (0,16)	0	0	0	0	0	0
Оборонительная	Затаивание	0,14	0,21	0,18	0,21	0,18	0,18	0,21	0,39
	Бегство	0,18	0,14	0,25	0,25	0,21	0,18	0,21	0,28

Примечание: «-» – отсутствие данных

Лосиха кормит лосят лежа только во время первого кормления (Минаев, 1992). При первых кормлениях из соски лосевод поднимал голову лосенка кверху и имитировал расстояние до вымени матери в положении стоя. Бутылочку с соской использовали только в первый месяц жизни. Далее лосят переводили на кормление молоком из поильника. Молочную подкормку применяли до 4-х месяцев жизни, что соответствует периоду молочного кормления диких лосят (Кнорре, 1959, 1961; Кожухов, 1965). Однако в эксперименте ло-

сята сосали лосиху и дольше – до 4,5–6,5 месяцев (Минаев, 1992). У лосят не наблюдали «проглатывание земли», которое отмечали ряд авторов (Кнорре, 1959; Stringham, 1971; Cederlund, 1987; Минаев, 1992). Вероятно, что минеральная подкормка, предоставляемая лосят на лосеферме в настоящее время, и при-сущая жвачным в форме литофагии (Nealy et al., 1970; Паничев, 2011; и др.), обеспечивает потребности животных.

Основной пищевой паттерн – «жвачка» – постепенно развивался с раннего воз-

раста параллельно с сосанием (рис. 1). Уже в первые часы жизни лосята жевали зеленые листья. Их глотание начиналось с возраста двух-трех недель. С месячного возраста растения составляли заметный компонент рациона, и их нечастое потребление небольшими порциями сопровождалось жвачкой с отрыжкой и повторным пережевыванием. В полной мере паттерн жвачки формировался с двух месяцев жизни, когда лосята начали быстро откусывать тонкие побеги деревьев, что сопровождалось пережевыванием, проглатыванием, отрыжкой и повторным пережевыванием начавшейся перевариваться пищи. Защита от конкурентов определенной бутылочки с соской и постоянного места кормления у лосят отсутствовала. Обычно первыми к соску, позже к поилке, направлялись самцы. После формирования паттерна жвачки с августа время, затрачиваемое лосятами на поедание твердых кормов, заняло в среднем 17,4 % за сутки. На откусывание, первую и повторные жвачки, глотание и отрыжку лосята затрачивали около 19 % времени. Откусы коры происходили в среднем 7,6 раза за сутки.

Контакты лосят с матерью на лосеферме (первая стадия социальной интеграции) прерывались не позднее вторых суток после рождения. Однако за это время у лосенка в достаточной мере формировался образ вида, что затем подкреплялось контактами с другими лосями. Второй этап развития социального поведения начинался с формирования лосеводами общей группы и естественной реакции скучивания, обеспечивающей лучшую терморегуляцию и контакты между особями. С первых часов жизни развивалась реакция следования за лидером, в природе за матерью, на ферме – за лосеводом и за лосенком-лидером. Проявления агонистического и игрового поведения происхо-

дили после первых 6–7 суток жизни, когда у лосенка в достаточной мере формировалась координация движений, и к 2–4 дням жизни они были способны к бегу. «Бодание», характерное для игрового поведения, имеет полифункциональное значение при несколько разном исполнении. В виде толчков вверх и вперед оно наблюдалось при подходе к соску матери и стимуляции экскреции молока. Бодание вымени отмечала также Седерлунд (Cederlund, 1987). Лосята также толкали головой поильник вплоть до 2–2,5 месяцев жизни. Кроме того, у самцов, особенно у Нелдая, с возраста 6–7 месяцев в сентябре наблюдали бодание кустов и однажды копание Нелдаем грунта передними ногами. Однако А.Н. Мишаев (1992) наблюдал подобные действия у лосят в возрасте около месяца, в играх особей обоего пола с 20–30 дней жизни – элементы турнирного поведения самцов: параллельное шествие с партнером, движение с приподнятой головой и изогнутой шеей. Лосята бодали кусты и копали в присутствии других самцов. В природе такое поведение у взрослых самцов обычно реализуется также в группах с другими самцами (Зайцев, 2000).

В игровом поведении выделено шесть основных действий: толкание (с «наваливанием» боком одной особи на другую), бодание (у самцов, самок), в том числе при инициации игры, удары копытом, покусывание – подергивание за волосяной покров разных частей тела другой особи. Последние два действия лосята применяли с гораздо меньшей силой (касание), чем во время явной агрессии, при выражении недовольства лосенком соседства с другим. Затем нередко происходило игровое преследование партнера. Локомоторные игры в одиночку: подпрыгивание на месте, брыканье задними ногами нечасто происходили с 4–6 дней после рождения, когда постепенно развивалась координация движений.

Первое проявление игрового взаимодействия зафиксировано в возрасте 6 дней. Вначале наблюдалось толкание и бодание головой. К 3–4 неделям появилось слабое покусывание за волосяной покров другой особи и преследование, затем удары копытами. В играх более взрослых сеголетков (табл. 3) наиболее часто регистрировали толкание соседа (в среднем 0,66 раза в час за период активности лосят) и бодание головой – 0,29 раза в час. Эти паттерны доминировали в игровом поведении у лосят до года жизни: 55,8 % – толкание, 25 % – бодание головой. Реже отмечали удары копытом (6,6 %) и покусывание (12,6 %). Самцы в играх друг с другом применяли «бодание» чаще, чем в играх с самками.

С возраста 1–1,5 месяца в играх и самцов, и самок появились элементы, присущие сексуальному поведению: попытки вспрыгивания на партнера, еще раньше – флемен. Одомашниваемые лосихи демонстрировали такие действия в основном до возраста 3–4 лет, пытались вскочить не только на другую лосиху, но и на доярку. Более часто (с конца августа по конец сентября 2014 г. три раза за 14 дней; данные Н.В. Соколова) такое поведение характерно для лосей возраста от двух до трех лет по отношению к более молодым, особенно, 1,5-годовалым и самцам, и самкам.

В агонистическом, а также и в оборонительном поведении мы выделяли следующие акты: «направленный удар передними копытами», т.е. по другому лосю, в том числе через сетку забора, «ненаправленный удар передними копытами» не по лосю, а в сторону от него, в воздухе, также и «направленный...» и «ненаправленный удар задними копытами», «преследование» лосенка другим» (табл. 2). «Ненаправленные...» удары часто сопровождалась вначале фырканием, прижиманием ушей, иногда одиночными ударами передней ногой о землю, подобием

«царапания» почвы, что, вероятно, показывало недовольство присутствием соседа и имело характер предупреждения. В группе сеголетков удары ногами регистрировали нечасто, и их число за час наблюдений существенно варьировало (0,32 в час;  $SD = 0,316$ ;  $n = 38$ ). Количество всех ударов передними ногами (0,21 в час;  $SD = 0,493$ ;  $n = 38$ ) несущественно ( $WM-test - z = 0,560$ ;  $p = 0,575$ ) превышало число ударов задними ногами (0,14 в час;  $SD = 0,518$ ;  $n = 38$ ). Синхронизацию ударов сразу нескольких лосят по соседям наблюдали всего один раз.

Наибольшее количество элементов агрессивного поведения, включающего направленные удары ногами, демонстрировал лосенок Навал – 0,14 ударов в час (Нелдай – 0,11, от 0 у Яндеры, Ястеры, Натуси, Весны и Нанами до 0,03 у Ветры). Навал выделен впоследствии в качестве лидера и доминанта ( $\alpha$ -особь) общей группы лосят. Удары передними копытами Навала по соседней особи или в ее сторону с фырканием и прижиманием ушей, дальнейшим коротким преследованием нередко было направлено на Нанами – не родственную ему по матери, имеющую при рождении наименьшую массу среди лосят (табл. 1). Лосята-самки, например, в группе «Яндера–Ястера» демонстрировали преимущественно возможность нанесения прямого удара ногами или покусывали за волосы. В целом характерна отрицательная связь рангового положения особи (в форме 1, 2...n) с числом ударов, нанесенных партнерам, демонстраций агрессии:  $r^2 = 0,761$ ;  $p = 0,005$ .

Преследование одного лосенка другим бегом после стычки присуще прежде всего самцам (табл. 2). Лосята, обычно подвергающиеся нападениям в группе, имеющие невысокий иерархический ранг, убегали даже при приближении к ним другого лосенка. Так, Нанами в этих случаях нередко стремительно

удалялась на десятки метров, обособлялась от группы на длительное время.

Число наблюдений бегства обусловлено нередко случайным появлением каких-либо неопределенных для лосят тревожащих стимулов, объектов. Однако отмечалось устойчивое уменьшение числа случаев бегства по мере взросления лосят с 1,85 в час ( $SD = 1,814$ ;  $n = 20$ ) в мае-июне до 0,5 в час ( $SD = 0,857$ ;  $n = 18$ ) в июле-августе: *WM-test* –  $z = 2,314$ ;  $p = 0,021$ .

Дикие лоси нередко подпускают автотранспорт на более близкие расстояния, чем человека в лесу. На этом в 1990-х гг. был основан способ браконьерской их добычи с колесных тракторов в ярославских лесах (Зайцев, 2006). Лоси гибнут и при столкновении с тепловозами, выходя к железнодорожному полотну на пастьбу среди молодой поросли осины и ивы. Однако на лосеферме звуки приближающегося трактора, машины служили причиной бегства сеголетков до 2–3 месяцев их жизни. С июля лосята постепенно привыкали к подобным звукам и в августе подпускали работающий трактор на 10–20 м. С началом регулярной подкормки осенью и зимой реагирование лосят на трактор менялось на противоположное. Все лоси при звуках работающего трактора устремлялись к месту подкормки, пытались овладеть кормом еще до начала его выгрузки. Все эти факты свидетельствуют, что период повышенного реагирования на неопределенные стимулы, не свойственные естественной среде обитания, как на вероятную опасность, у лосят в основном заканчивается в июле.

Своеобразное реагирование лосят до шести-семи дней жизни на тревожные стимулы выражалось в вытягивании тела и как бы прижимании стоя его к земле. Е.П. Кнорре (1961) и Седерлунд (Cederlund, 1987) предполагают, что такое предрасполо-

женное реагирование характерно до окончания периода импринтинга конспецификов и при недостаточно развитой реакции бегства. Затаивание лежа – паттерн пассивно-оборонительного поведения, появлялось у лосят в первые часы жизни. Позднее затаивание было нередким в случаях, когда лосята подходили к месту пастьбы лосихи, и самка приближалась к лосятам. Последние, в свою очередь, ложились в траву, прижимали уши и неподвижно лежали до тех пор, пока лосиха не удалялась на расстояние больше 10 м. Данное поведение у самки-лосенка Нанами регистрировали в 2,1 раза чаще, чем у Наваля и в 1,6 раза чаще, чем в среднем в выборке. Число затаиваний у лосят уменьшилось с мая-июня (2,15 в час;  $n = 20$ ;  $SD = 1,872$ ;  $CV = 87,05$  %) к началу июля и в августе (0,22 в час;  $n = 18$ ;  $SD = 0,428$ ;  $CV = 192,51$  %): *WM-test* –  $z = 2,919$ ,  $p = 0,004$ . Подражание действиям друг друга обусловило почти одновременное затаивание двух-шести лосят группы в 36 случаях из 43 регистраций в мае-июне. Но в июле-августе отметили всего 4 разрозненных случая затаивания за 18 часов.

Родственные и дружеские связи, формирующаяся иерархия и индивидуальные особенности особей способствовали тому, что с переводом из боксов в загоны лосята начинали распределяться по подгруппам из 2–4 особей. В первую подгруппу входили два брата самца: Наваля и Нелдай с примкнувшими к ним двумя сестрами от другой матери: Весна, Ветра. Подгруппа характеризовалась повышенной частотой и разнообразием проявлений агрессии и игр (174) в отличие от второй подгруппы с невысокими показателями и более ограниченным набором агрессивных и игровых (60) действий (табл. 2, 3). Различия между подгруппами для распределений с последовательным порядком рангов от высшего к низшему внутри первой ( $\bar{x}_1 = 8,3$ ;

$SD = 8,254$ ) и второй ( $\bar{x}_2 = 4,6$ ;  $SD = 6,384$ ) подгрупп существенны:  $\chi^2 = 117,70$ ,  $df = 12$ ,  $p < 0,001$ . Во вторую подгруппу входили две сестры: Яндера ( $\alpha$ ), Ястера, к которым примыкала лосенок-самка Натуся. Реже в данную подгруппу входила Нанами, которая, однако, часто держалась обособленно от лосят двух подгрупп. Такой состав подгрупп сохранялся и на пастбище ночью. В подгруппах выделялись более сплоченные объединения из двух родственных по матери лосят. Подгруппы формировались с раннего возраста, и их состав сохранялся весь первый год жизни лосят.

Инициатор обычно побеждал в игре, но в некоторых случаях лосята игнорировали его действия. В подгруппе «Яндера – Ястера» последняя обычно инициировала игры, первая – стычки. Ветра очень редко наносила прямые удары, Весна только демонстрировала такую возможность, как и Нанами. Ранг особи (в форме: 1, 2, 3...N) в общей группе одногодков вполне определенно ( $r_s = -0,719$ ;  $p < 0,05$ ) связан с ее массой при рождении

(табл. 1). Игры происходили чаще между родственными особями – в 60 % от 224 игр. На двух родственников приходилось в среднем 56 игр ( $n = 4$ ;  $SD = 37,37$ ); на двух любых неродственных лосят – 5,8 ( $n = 24$ ;  $SD = 10,77$ ). Значительное число игр (30 %) со всеми лосятами инициировал и выигрывал Навал. Нередко наблюдали его игры с доминантом второй подгруппы Яндерой (38 игр), а также между самками субдоминантами своих подгрупп Ястерой и Ветрой (56 игр). Нелдай, проигрывающий Навалу в агрессивных контактах, инициировал в паре с последним почти столько же игр, как и Навал с Нелдаем, используя такой же набор актов (*WM-test*:  $z = 1,826$ ;  $p = 0,068$ ), но ограничивал число игр с самками. Последние не инициировали конфликты и игры с самцами-братьями.

#### Особенности поведения лосей второго года жизни

Пищевое поведение, связанное с использованием обычных для лося кормов, у лосей

Таблица 3. Вид и число игровых актов между лосятами-сеголетками (за 309 часов наблюдений)

Table 3. The type and number of play acts between moose calves-under-yearlings (for 309 hours of observations)

	Партнер								
	Навал	Нелдай	Весна	Ветра	Яндера	Ястера	Натуся	Нанами	
Инициатор, победитель	Навал	-	p24; b16; k3; t5	t9	t7	p28; b9; p1	0	k14; t4	k3; t3
	Нелдай	p26; b20; k6; t7	-	0	0	0	0	k2	0
	Весна	0	0	-	p15; b7; k2; t5	0	0	0	0
	Ветра	0	0	p18; b13	-	0	p16; b16	0	0
	Яндера	0	0	0	0	-	0	0	0
	Ястера	0	0	0	p17; k3; t4	p19; b4	-	0	t4
	Натуся	0	0	0	0	0	k3	-	p14; b6; t2
	Нанами	0	0	0	0	0	0	b12	-

Обозначения: p – толкание; b – бодание; k – удары копытом; t – кусание; цифры после букв показывают, сколько раз наблюдали эти действия.

Таблица 4. Время (мин/сутки, среднее  $\pm$  SD), затрачиваемое лосятами разных возрастных групп на основные акты пищевого поведения, и число раз питания корой осины за часTable 4. Time (minutes per day; average  $\pm$  SD) spent by moose calves of different age groups on the main acts of eating behavior and the number of times of feeding on aspen bark per hour

Кличка лосенка	Время, затрачиваемое лосятами на разные действия					
	Лосята от 2 до 12 месяцев жизни			Лосята второго года жизни		
	Жвачка, полные циклы	Поедание твердого корма	Откусы коры (раз/час)	Жвачка	Поедание твердого корма	Откусы коры (раз/час)
Навал	314,8 $\pm$ 16,4	251,1 $\pm$ 20,1	0,34	335,6 $\pm$ 19,8	231,7 $\pm$ 19,3	0,63
Нелдай	306,6 $\pm$ 14,3	243,6 $\pm$ 19,4	0,54	-	-	-
Весна	297,3 $\pm$ 14,5	254,9 $\pm$ 18,3	0,46	304,3 $\pm$ 15,1	221,8 $\pm$ 18,2	0,96
Ветра	297,3 $\pm$ 14,5	254,9 $\pm$ 18,3	0,46	-	-	-
Яндера	317,9 $\pm$ 13,3	261,6 $\pm$ 19,2	0,17	218,4 $\pm$ 12,2	242,6 $\pm$ 19,6	0,70
Ястера	312,6 $\pm$ 13,7	257,9 $\pm$ 20,8	0,42	363,5 $\pm$ 11,2	239 $\pm$ 17,3	1,08
Натуся	308,3 $\pm$ 12,9	243,2 $\pm$ 20,4	0,38	-	-	-
Нанами	301,4 $\pm$ 13,1	237,2 $\pm$ 19,9	0,25	-	-	-

данной возрастной группы не отличается от поведения более взрослых лосей. Баланс времени, затрачиваемого на жвачку и питание твердым кормом, у каждого лосенка остался почти таким же, как и у сеголетков (табл. 4). Однако в сравнении с сеголетками в 2,5 раза увеличилось число погрызов коры деревьев, особенно с весны до осени, что связано, вероятно, с полным развитием пищеварительной системы.

Если у лосят-сеголетков многие взаимодействия в итоге сводились в игровую форму (с незавершенными результатами), то у лосят класса возраста (1–2) года игровое поведение стало появляться реже. К сентябрю и позднее оно почти заместилось на паттерны агрессивного и оборонительного поведения, увеличилось число агонистических актов. «Направленные удары» ногами четыре оставшиеся особи использовали заметно чаще (0,88 в час;  $SD = 0,711$ ), чем те же сеголетки (0,25 в час;  $SD = 0,523$ ): *WM-test*;  $z = 2,346$ ;  $p = 0,019$ , чаще преследовали партнера. Навал нередко в стычках бодал партнера, у самок бодание

не замечено. «Ненаправленные удары» передними и задними ногами (0,08 в час;  $SD = 0,277$ ) наблюдали гораздо реже, чем «направленные удары» в мае-июне (0,77;  $SD = 0,725$ ): *WM-test*;  $z = 2,366$ ;  $p = 0,017$ ; «ненаправленные удары» задними ногами в ответ на агрессию или приближение партнера – несколько реже, чем передними (табл. 5).

Число затаиваний у оставшихся четырех лосят в ответ на незнакомые стимулы, при приближении к ним взрослых лосей имело неявную тенденцию снижения с мая-июня (0,42 в час;  $SD = 0,669$ ;  $n = 8$ ) к июлю-августу (0,25;  $SD = 0,453$ ;  $n = 9$ ): *WM-test* –  $z = 0,674$ ;  $p = 0,50$ . У лосей возраста (1–2) года затаивание в мае-июне 2019 г. наблюдали реже, чем в те же месяцы 2018 г.: *WM-test* –  $z = 2,090$ ;  $p = 0,037$ . Для июля-августа, однако, различия незначительны. Неопределенная тенденция, связанная с числом тревожащих стимулов, характерна для активного избегания: с 0,86 в час ( $SD = 0,964$ ;  $n = 21$ ) у сеголетков до 1,0 в час ( $SD = 1,216$ ;  $n = 24$ ) у особей класса (1–2) года: *WM-test* –  $z = 1,569$ ;  $p = 0,117$ .

Таблица 5. Число актов (за час; в скобках – стандартное отклонение *SD*) нескольких активностей поведения, регистрируемое у лосят второго года жизни в мае-августе 2019 г.

Table 5. The number of acts (per hour; standard deviation *SD* in brackets) of several behaviors recorded in one-year-old moose calves during May-August 2019

Активности поведения	Элементы поведения	Лосята и нумерация их рангов иерархии			
		Навал	Весна	Яндера	Ястера
		1	2	3	4
Социальная, агонистическое поведение	Направленный удар передними копытами	0,67 (0,51)	0,34 (0,44)	0,06 (0,21)	0,11 (0,28)
	Ненаправленный удар передними копытами	0,28 (0,42)	0	0,06 (0,21)	0
	Направленный удар задними копытами	0,11 (0,28)	0	0	0
	Ненаправленный удар задними копытами	0	0,11 (0,28)	0	0,11 (0,28)
	Бодание головой	0,06 (0,21)	0	0	0
	Преследование	0,38 (0,25)	0,11 (0,28)	0	0,06 (0,21)
Оборонительная	Затаивание	0,12 (0,28)	0,06 (0,21)	0,06 (0,21)	0,22 (0,38)
	Бегство	0,12 (0,28)	0,45 (0,48)	0,39 (0,44)	0,45 (0,48)

К возрасту 1,5–2 года среди лосят сохранялось явное доминирование и лидирование Навала ( $\alpha$ -особь), наиболее часто демонстрирующего агрессию (рис. 2). Число всех ударов копытами по соседу у Навала наблюдалось в 2,5 раза чаще, чем среднее значение по выборке и в 11,2 раза чаще, чем у лосихи Яндеры. Но акты пассивного и активного оборонительного поведения (затаивание, бегство) у Навала мы отмечаем почти в два раза реже среднего значения по группе и в три раза реже, чем у лосихи Ястеры.

Преобладание игровых паттернов у лосят в возрасте до года, замещающихся агонистическими действиями, привело к формированию иерархии (вначале в игровой форме), устойчивого порядка рангов и лидированию Навала в общей группе и первой подгруппе уже на первом году жизни, во второй подгруппе у особей второго года жизни – Яндеры. В общей группе поддерживалась линейная иерархия. При отсутствии четырех особей из прежнего состава группы лосиха Весна

заняла второе ранговое положение ( $\beta$ ), лосихи Яндера и Ястера – последующие ранги ( $\gamma$ ,  $\Omega$ ). Как и у сеголетков, среди более старших лосят выделялась ассоциация родственных по матери особей. При отсутствии Нелдая, его в группе с Навалом заменила Весна. Эти лосята, составляющие первую подгруппу, инициировали большее число агрессивных действий (38 из 44 наблюдений), чем сестры Яндера и Ястера второй подгруппы. При возросшем количестве агрессивных актов среди лосей они были направлены, однако, не только на обычно проигрывающих стычки особей своего возраста (табл. 3), но и на лосят нового поколения, над которыми они явно доминировали.

Группы из двух особей, присущие распределению сеголетков, при изменившемся составе характерны и для более старших лосят в загоне и при выпасе в лесу. Большинство (до 80 %) лосей, в том числе сеголетки, в загоне также образовывали небольшие сплоченные группы. При этом общие группы лосят,

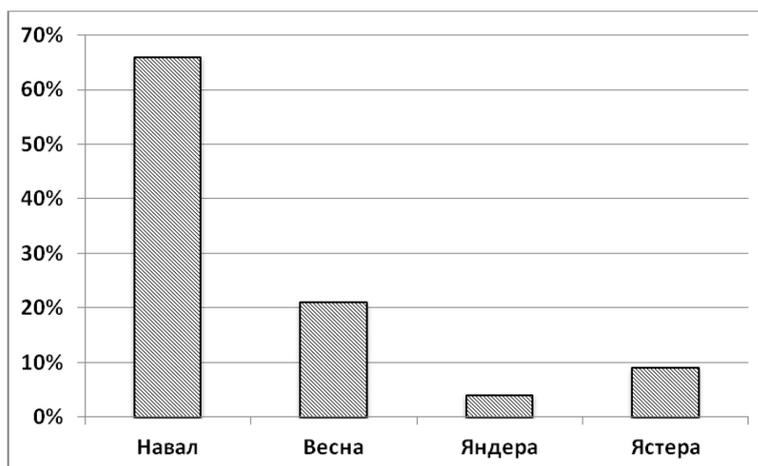


Рис. 2. Проценты частот проявлений агонистического поведения лосят второго года жизни

Fig. 2. Percentages of frequencies of agonistic behavior in one-year-old moose calves

ранее придерживающихся друг друга, постепенно распадались, 1,5-годовалые лоси нередко покидали свою группу и присоединялись к более старшим особям, особенно к 2,5–3-годовалым лосям.

Пассивный оборонительный паттерн – затаивание, характерный для лосят-сеголетков в случае встречи с другим лосем, особенно с рождения до конца июня, замещался на действия, обусловленные социальной мотивацией. Согласно результатам исследований в Центральной России, 1–2-годовалые особи, особенно самцы, наиболее часто примыкают к разным ассоциациям, обычно объединяются в группы с самцами разного возраста, в которых доминируют более старшие особи, примыкают к самкам, в том числе вместе со старшими самцами, в период гона выявляют сексуальное поведение (следование за самкой, флэмен). В январе-марте в группах самцов они также иногда лидировали в движении (Зайцев, 1994). Лидирование, подобное регулярному первенству лосенка Навала на ферме, не обязательно соотносится с высоким иерархическим рангом у особей одного пола.

Полученные результаты, как и данные других авторов (Markgren, 1966; Cederlund, 1987; Минаев, 1992; Stringham, 1971, 1974; Смиренина и др., 1983; Bogomolova et al., 2002; и др.), безусловно, не характеризуют всего разнообразия отношений между лосятами. Немного данных и об иерархических в целом социальных контактах и связях и в разных объединениях диких лосей. В смешанных группах лосей в России, Северной Америке, Скандинавии (Skuncke, 1949; Кнопере, 1973; Sweanor, Sandegren, 1987; Зайцев, 1994, 2000; Franzmann, Schwartz, 2007) отмечено проявление агрессии самок с лосятами и доминирование их над самцами зимой, лидирование в движении и др. Разные способности особей к социальной интеграции при формировании ассоциаций на ферме согласуются с разнообразием, подвижностью социальной и пространственной организации популяции диких лосей. Следует выделить самку-сеголетка Нанами, имеющую небольшой иерархический ранг среди одногодков, стремление к уединению на значительных расстояниях от группы, что также согласуется с результатами исследований лосей дикой популяции. В объеди-

нении лосей, перемещающихся рассредоточенной – дистантной группой (Зайцев, 2000), не раз встречали молодых лосих, отстающих от других лосей на расстояния вплоть до 1–7 километров, остающихся на прежних участках, затем перемещающихся вслед за объединением.

Естественные репродуктивные группы, т.е. лосята с лосихами, с начала рождения лосят и в основном до следующего периода родов у диких лосей не превышают 3–4 особей, включая лосиху. Тем не менее формирование в боксах и загоне больших групп лосят-сеголетков, а в «зимних лагерях» концентраций сплоченных групп и одиночек многих лосей не противоречит данным, полученным в природе. В некоторых случаях лосихи вместе с лосятами дикой популяции концентрировались часть суток на небольших площадях (по 2–4 лосихи с лосятами на  $\approx 0,5$ –1 га леса, в пределах видимости друг друга). Каждая лосиха находилась со своим потомством, и лосята из разных групп, вероятно, не имели долгих тесных контактов друг с другом. Затем лосихи со своими лосятами расходились, собирали корм, но ко времени длительного дневного отдыха вновь собирались на небольших участках (Зайцев, 2000). Дружеские связи между лосихами отмечены и на лосеферме нами и А. Н. Минаевым (1992). Непродолжительные концентрации до 11–14 лосей наблюдали в период гона (в сентябре–октябре) в Ярославской области (Зайцев, 1994). Сосредоточение на 5–7 га леса четырех лосих в местах родов и с новым потомством происходило каждую весну в 1980–2000-х гг. на биостанции ИПЭЭ РАН в Костромской области. Тем не менее на ферме лосята имели возможность более тесных контактов со многими сверстниками, что приводило, в нашем случае, к развитию социальных связей, иерархии среди особей общей группы.

## Заключение

Согласно результатам, все активности поведения развиваются с раннего возраста лосят вместе с развитием координации движений, проявляясь вначале в качестве врожденных имитационных и своеобразных переадресованных реакций с дальнейшим замещением, расширением или ограничением их функций в соответствии со своим назначением для особей разного пола (для «бодания», «покусывания», элементов сексуального, турнирного поведения и др.). Наиболее раннее полное развитие характерно для паттернов, обеспечивающих жизнедеятельность и развитие организма: «сосания» в первые часы жизни, «жвачки» к двум месяцам жизни при совмещении этих паттернов в период смешанного питания до 4–6,5 месяцев. Становление паттернов других активностей растягивается вплоть до двух и более лет (социального, сексуального). Время развития паттернов, обеспечивающих жизнедеятельность и социальную интеграцию, остается достаточно постоянными в разных условиях содержания, что характеризует видовую специфику онтогенеза поведения.

Социальная интеграция на ферме начинается с первых минут жизни лося, когда в основном формируется образ вида на основе врожденных установок, реакции скупивания и импринтинга конспецификов (также лосевода). Еще в первый месяц жизни при содержании общей группой лосята объединяются с родственниками, другими особями, что свидетельствует о ранней способности к индивидуальному опознаванию конспецификов. Привязанность лосят друг к другу на основе родства, дружеских отношений и предпочтений способствует формированию сплоченных подгрупп внутри общей группы. Наиболее устойчивы подгруппы родственных по матери особей, что имеет основу в консолидации лосят-родственников в дикой популяции.

В социальных взаимодействиях лосят выявлены значительные индивидуальные, групповые особенности. Для доминирующих особей характерно, но не всегда, наибольшее число актов игрового и агонистического поведения при общей небольшой частоте данных контактов в группе. Игровая иерархия, развивающаяся с первых месяцев жизни лосят, к 1,5-годам почти полностью заместилась на иерархию, основанную на агрессивных контактах.

К июлю-августу первого года жизни значительно изменилось соотношение паттернов оборонительного поведения при замещении пассивно-оборонительных паттернов на активно-оборонительные. Реагирование на стимулы, не характерные для естественной среды обитания и воспринимающиеся

лосятами как, вероятно, опасные до 2–3 месяцев жизни, менялось на противоположное при подкреплении привлекательным стимулом.

Содержание на ферме больших групп лосят без матерей и концентраций взрослых лосей имеет предпосылки в поведении лосей дикой популяции. Однако к двум годам жизни социальная организация лосей на ферме приобретает все больше свойств дикой популяции. Анализ результатов изучения поведения и структуры популяции фермерских лосей в сравнении с дикими лосями, чье поведение формировалось в течение длительной эволюции, позволяет оценить и избежать ошибок в опытах по одомашниванию и наметить оптимальный режим содержания лосей на фермах.

#### Список литературы / References

- Баскин Л. М. (1978) Поведение новорожденных копытных. *Природа*, 7: 96–106 [Baskin L. M. (1978) Behavior of newborn ungulates. *Nature* [Priroda], 7: 96–106 (in Russian)]
- Баскин Л. М. (1984) Лось. *Животный мир южной тайги*. Соколов В. Е. (ред.) Москва, Наука, с. 45–72 [Baskin L. M. (1984) Moose. *Animal world of the southern taiga*. Sokolov V. E. (ed.) Moscow, Nauka, p. 45–72 (in Russian)]
- Баскин Л. М. (1986) Поведение лося и domestикация. *Биология и использование лося: обзор исследований*. Москва, Наука, с. 71–87 [Baskin L. M. (1986) Moose behavior and domestication. *Biology and use of moose: A review of research*. Moscow, Nauka, p. 71–87 (in Russian)]
- Богомолова Е. М., Курочкин Ю. А. (1980) Импринтинг как фактор консолидации в формировании поведенческих функциональных систем новорожденного лосенка. *Копытные фауны СССР*. Москва, Наука, с. 279–281 [Bogomolova E. M., Kurochkin Yu. A. (1980) Imprinting as a factor of consolidation in the formation of behavioral functional systems of a newborn moose calf. *Ungulates of the USSR*. Moscow, Nauka, p. 279–281 (in Russian)]
- Богомолова Е. М., Курочкин Ю. А. (1984) Роды у лосих. Поведение лосихи и новорожденного лосенка. *Зоологический журнал*, 63(11): 1713–1724 [Bogomolova E. M., Kurochkin Yu. A. (1984) Calving of moose cows. Moose cow behavior and newborn calf. *Zoological Journal* [Zoologicheskii Zhurnal], 63(11): 1713–1724 (in Russian)]
- Глушков В. М. (2001) Лось. *Экология и управление популяциями лося*. Киров, 317 с. [Glushkov V. M. (2001) Moose. *Ecology and management of moose populations*. Kirov, 317 p. (in Russian)]
- Готовцев В. В. (1983) Проблемы разведения и селекции лосей при их domestикации. *Проблемы domestикации животных*. Л. В. Давлетова (ред.) Москва, Институт эволюционной мор-

фологии и экологии животных им. А.Н. Северцова, с. 135–136 [Gotovtsev V. V. (1983) Problems of raising and breeding of moose during their domestication. *Problems of animal domestication*. L. V. Davletova (ed.) Moscow, A. N. Severtsev Institute of Evolutionary Morphology and Ecology of Animals, p.135–136 (in Russian)]

Данилкин А. А. (1999) *Олени (Cervidae)*. Москва, ГЕОС, 552 с. [Danilkin A. A. (1999) *Deer (Cervidae)*. Moscow, GEOS, 552 p. (in Russian)]

Джурович В. М., Витакова А. Н., Михайлов А. П., Богомолова Е. М., Курочкин Ю. А. (1984) *Методические рекомендации по выращиванию молодняка лосей, содержанию и доению лосих*. Кострома, 28 с. [Dzhurovich V. M., Vitakova A. N., Mikhailov A. P., Bogomolova E. M., Kurochkin Yu. A. (1984) *Guidelines for raising young moose, keeping and milking moose*. Kostroma, 28 p. (in Russian)]

Зайцев В. А. (1994) Пространственная структура популяции лося центральной части Европейской России. *Бюллетень московского общества испытателей природы. Отдел биологический*, 99(3): 3–14 [Zaitsev V. A. (1994) Elk population spatial structure of European Russia central part. *Bulletin of Moscow Society of Naturalists. Biological Series* [Byulleten moskovskogo obshchestva ispytatelei prirody. Otdel biologicheskii], 99(3): 3–14 (in Russian)]

Зайцев В. А. (1995) Иерархические отношения и поведение кабанов в конфликтных ситуациях. *Бюллетень московского общества испытателей природы. Отдел биологический*, 100(4): 16–29 [Zaitsev V. A. (1995) Hierarchy relations and behavior of *Sus scrofa* L. in conflict situations. *Bulletin of Moscow Society of Naturalists. Biological Series* [Byulleten moskovskogo obshchestva ispytatelei prirody. Otdel biologicheskii], 100(4): 16–29 (in Russian)]

Зайцев В. А. (2000) Использование участков обитания и пространственная структура популяций у лесных копытных Artiodactyla. *Зоологический журнал*, 79(4): 397–411 [Zaitsev V. A. (2000) The use of home ranges and the spatial structure of populations of forest ungulates Artiodactyla. *Zoological Journal* [Zoologicheskii Zhurnal], 79(4): 397–411 (in Russian)]

Зайцев В. А. (2006) *Позвоночные животные северо-востока Центрального региона России (виды фауны, численность и ее изменения)*. Москва, Товарищество научных изданий КМК, 513 с. [Zaitsev V. A. (2006) *Vertebrate animals in the North-East of the central region of Russia (fauna species, number and its changes)*. Moscow, KMK Scientific Press, 513 p. (in Russian)]

Кнорре Е. П. (1959) Экология лося. *Труды Печоро-Илычского заповедника. Вып. 7*. Сыктывкар, с. 5–122 [Knorre E. P. (1959) Ecology of moose. *Proceedings of the Pechero-Ilych Reserve. Issue 7*. Syktyvkar, p. 5–122 (in Russian)]

Кнорре Е. П. (1961) Итоги и перспективы одомашнивания лося. *Труды Печоро-Илычского заповедника. Вып. 9*. Сыктывкар, с. 5–113 [Knorre E. P. (1961) Results and prospects of moose domestication. *Proceedings of the Pechero-Ilych Reserve. Issue 9*. Syktyvkar, p. 5–113 (in Russian)]

Кнорре Е. П. (1969) Изменение поведения лося в процессе его одомашнивания. *Поведение животных и проблема одомашнивания*. Москва, Наука, с. 13–20 [Knorre E. P. (1969) Changes in the behavior of moose in the process of domestication. *Animal behavior and the problem of domestication*. Moscow, Nauka, p. 13–20 (in Russian)]

Кнорре Е. П. (1973) История и итоги проведенных опытов по одомашниванию лося. *Одомашнивание лося*. Москва, Наука, с. 12–16 [Knorre E. P. (1973) History and results of experiments on the domestication of moose. *Domestication of moose*. Moscow, Nauka, p. 12–16 (in Russian)]

Кожухов М. В. (1965) Гигиена лосеводства. *Биология и промысел лося*. Вып. 2. Москва, Россельхозиздат, с. 162–218 [Kozhukhov M. V. (1965) Hygiene of moose farming. *Biology and hunting of moose*. Issue 2. Moscow, Rosselkhozizdat, p. 162–218 (in Russian)]

Кожухов М. В. (1973) Итоги 20-летней экспериментальной работы по одомашниванию лося в Печоро-Илычском заповеднике. *Одомашнивание лося*. Москва, Наука, с. 17–27 [Kozhukhov M. V. (1973) Results of 20-year experimental work on the domestication of moose in the Pechora-Ilych Reserve. *Domestication of the moose*. Moscow, Nauka, p. 17–27 (in Russian)]

Минаев А. Н. (1992) *Поведение лося в условиях доместикации (биотелеметрическое исследование)*. Автореферат диссертации кандидата биологических наук. Москва, ИЭМЭЖ РАН, 20 с. [Minaev A. N. (1992) *Behavior of moose under domestication conditions (biotelemetric studies)*. Abstract of PhD dissertation. Moscow, IEMEA RAS, 20 p. (in Russian)]

Минаев А. Н. (2003) Лось как домашнее животное России. *Агроэкологический вестник*, 5: 17–19 [Minaev A. N. (2003) Moose as a domestic animal in Russia. *Agroecological Bulletin* [Agroekologicheskii vestnik], 5: 17–19 (in Russian)]

Паничев А. М. (2011) *Литофагия. Геологические, экологические и биомедицинские аспекты*. Христофорова Н. К. (ред.) Москва, Наука, 149 с. [Panichev A. M. (2011) *Lithophagy. Geological, ecological and biomedical aspects*. Khristoforova N. K. (ed.) Moscow, Nauka, 149 p. (in Russian)]

Смиренина Л. К., Миронова Л. В., Алексеевский А. В. (1983) О взаимоотношениях в группе одомашниваемых лосей. *Бюллетень московского общества испытателей природы. Отдел биологический*, 88(1): 35–39 [Smirenina L. K., Mironova L. V., Alexeevskiy A. V. (1983) On the interactions in a group of domesticated European elks. *Bulletin of Moscow Society of Naturalists. Biological Series* [Byulleten moskovskogo obshchestva ispytatelei prirody. Otdel biologicheskii], 88(1): 35–39 (in Russian)]

Смирнов М. Н. (2014) *Лось и кабан в Центральной Сибири*. Красноярск, Сибирский федеральный университет, 298 с. [Smirnov M. N. (2014) *Moose and wild boar in Central Siberia*. Krasnoyarsk, Siberian Federal University, 298 p. (in Russian)]

Соколов Н. В. (2012) *Лось европейский и его одомашнивание*. Кострома, Авантитул, 152 с. [Sokolov N. V. (2012) *The European moose and its domestication*. Kostroma, Avantitul, 152 p. (in Russian)]

Соколов Н. В., Соколов А. Н., Ситникова О. Н. (2015) Модернизация технологии передержки лосят. *Вестник ветеринарии*, 2: 69–71 [Sokolov N. V., Sokolov A. N., Sitnikova O. N. (2015) Modernized elk calves corralling technology. *Veterinary Bulletin* [Vestnik veterinarii], 2: 69–71 (in Russian)]

Филонов К. П. (1983) *Лось*. Москва, Лесная промышленность, 248 с. [Filonov K. P. (1983) *Moose*. Moscow, Lesnaya promishlennost, 248 p. (in Russian)]

Шварц Ч. С. (1990) Лосеводство в Северной Америке. *Третий Международный симпозиум по лосю*. Сыктывкар, с. 179 [Schwartz Ch. S. (1990) Moose breeding in North America. *The Third International Symposium on Moose*. Syktyvkar, p. 179 (in Russian)]

Altmann M. (1958) Social integration of the moose calf. *Animal Behaviour*, 6(3–4): 155–159

Baskin L. M. (1994) Population ecology of the moose in the Russian southern taiga. *Alces*, 30: 51–55

Bogomolova E. M., Kurochkin Yu. A., Minaev A. N. (2002) The study of moose behavior on the Kostroma moose farm. *Alces*, Supplement 2: 37–40

- Cederlund B.-M. (1987) Parturition and early development of moose (*Alces alces* L.) calves. *Swedish Wildlife Research*, Supplement 1, Part 1: 399–422
- Franzmann A. W., Schwartz C. C. (2007) *Ecology and management of the North American moose*. Boulder, The University Press of Colorado, 784 p.
- Healy W.B., McCabe W. J., Wilson G.F. (1970) Ingested soil as a source of microelements for grazing animals. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 13(3): 503–521
- Krzywinski A., Niedbalska A., Krzywinska K. (1987) Collection and freezing semen of the moose bull. *Swedish Wildlife Research*, Supplement 1, Part 2: 761–765
- Markgren G. (1966) A study of hand-reared moose calves. *Viltrevy*, 4(1): 1–42
- Pulliaainen E. (1974) Seasonal movements of moose in Europe. *Naturaliste Canadien*, 101(1–2): 379–392
- Renecker L. A., Hodson R. J., Lynch G. W. (1987) Moose husbandry in Alberta, Canada. *Swedish Wildlife Research*, Supplement 1, part 2: 775–780
- Scott J.P., Fuller J.L. (1965) *Genetics and the social behavior of the dog*. Chicago, London, University of Chicago Press, 468 p.
- Skuncke F. (1949) *Algen – Studier, jakt och vard*. Stockholm, P. A. Nordstedt & Söner, 400 p. (in Swedish)
- Stringham S. (1971) Calf behavior and the cow-calf bond in moose. *Alaska Cooperative Wildlife Research Unit. Quarterly Progress Report, April – June, 22*. p. 793–796
- Stringham S. F. (1974) Mother-infant relations in moose. *Naturaliste Canadian*, 101: 325–369
- Sweanor P. Y., Sandegren F. (1987) Agonistic interaction and association rates of wintering moose. *Swedish Wildlife Research*, Supplement 1: 793–796