

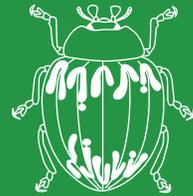
ISSN 0042-1324

Том 143, Номер 4

Июль - Август 2023



# УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ



[www.sciencejournals.ru](http://www.sciencejournals.ru)



# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 143, номер 4, 2023

---

---

Структура перитенонов паравертебральных сухожилий, обработанных гиалуроновой кислотой <i>А. А. Гайдаш, В. К. Крутько, А. И. Кулак, О. Н. Мусская, К. В. Скроцкая, Ю. П. Токальчик, В. А. Кульчицкий</i>	315
Сравнительные исследования комплексных средств на основе гепаринов животного и растительного происхождения <i>М. С. Успенская, Л. А. Ляпина, С. М. Сороколетов, М. Г. Ляпина, М. Д. Калугина</i>	329
Активация тромбоцитов и механизмы формирования тромбозов у больных с тяжелым течением COVID-19. Альтернативные механизмы деятельности системы гемостаза <i>Б. И. Кузник, Ю. Н. Смоляков, Н. Н. Цыбиков, К. Г. Шаповалов</i>	335
Токсические вещества и их источники в кормах для пушных зверей <i>С. В. Бекетов, И. В. Богомолова, М. Н. Прадед, И. В. Топорова, Л. В. Топорова, А. П. Каледин</i>	359
Преадаптивность несократительного термогенеза в эволюции теплокровности у позвоночных <i>В. А. Черлин</i>	375
Инвазионные растения России: результаты инвентаризации, особенности распространения и вопросы управления <i>С. А. Сенатор, Ю. К. Виноградова</i>	393
Микробная биомасса и ферментативная активность целинных и пахотных почв как показатели физиологического состояния микробных сообществ <i>Е. В. Чернышева, К. С. Дуцанова, Т. Э. Хомутова, А. В. Борисов</i>	403

---

---

# Contents

---

---

**Vol. 143, No. 4, 2023**

---

---

Structure of the Peritenons of the Paravertebral Tendons Treated by Hyaluronic Acid <i>A. A. Gaidash, V. K. Krut'ko, A. I. Kulak, O. N. Musskaya, K. V. Skrotskaya, Yu. P. Tokalchik, V. A. Kulchitsky</i>	315
Comparative Studies of Complex Products Based on Heparins of Animal and Plant Origin <i>M. S. Uspenskaya, L. A. Lyapina, S. M. Sorokoletov, M. G. Lyapina, M. D. Kalugina</i>	329
Platelet Activation and Mechanisms of Thromboembolism Formation in Patients with Severe COVID-19. Alternative Mechanisms of Hemostasis System Activity <i>B. I. Kuznik, Y. N. Smolyakov, N. N. Tsybikov, K. G. Shapovalov</i>	335
Toxic Substances and Their Sources in Feed for Fur-Bearing Animals <i>S. V. Beketov, I. V. Bogomolova, M. N. Praded, I. V. Toporova, L. V. Toporova, A. P. Kaledin</i>	359
Preadaptability of Non-Contractive Thermogenesis in the Evolution of Warm-Bloodedness in Vertebrates <i>V. A. Cherlin</i>	375
Invasive Plants of Russia: Inventory Results, Distribution Features and Management Issues <i>S. A. Senator, Yu. K. Vinogradova</i>	393
Soil Enzyme Activity in Natural and Ploughed Catenas as Parameters of Physiological State of Microbial Communities <i>E. V. Chernysheva, K. S. Dushchanova, T. E. Khomutova, A. V. Borisov</i>	403

---

---

УДК 57.085

## СТРУКТУРА ПЕРИТЕНОНОВ ПАРАВЕРТЕБРАЛЬНЫХ СУХОЖИЛИЙ, ОБРАБОТАННЫХ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ

© 2023 г. А. А. Гайдаш<sup>1</sup>, \*, В. К. Крутько<sup>1</sup>, А. И. Кулак<sup>1</sup>, О. Н. Мусская<sup>1</sup>, К. В. Скροцкая<sup>2</sup>, Ю. П. Токальчик<sup>3</sup>, В. А. Кульчицкий<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

\*e-mail: algaidashspb@gmail.com

Поступила в редакцию 06.02.2023 г.

После доработки 13.02.2023 г.

Принята к публикации 14.02.2023 г.

Изучены оболочки (перитеноны) паравертебральных сухожилий хвостов крыс Вистар с применением сканирующей электронной микроскопии. Приведена феноменологическая классификация остеоидных структур перитенонов с выделением персистирующих и перманентных их разновидностей. К персистирующим отнесены сесамовидные островки, игольчатые и пластинчатые разрастания, рудименты остеонов. Персистирующие остеоидные структуры хорошо подготовлены к трансформациям, направленным на упрочнение внутриклеточного матрикса при механических нагрузках. Перманентные остеоидные структуры – это микрогранулы и ограненные депозиты кальцийфосфатов, участвующие в структурно-механических процессах, гетеро- и гомогенной нуклеации. Гиалуроновая кислота разрыхляет матрикс сесамовидных островков, что увеличивает подвижность сесамовидных глобул, создает предпосылки миграции в зоны повышенной механической нагрузки и минерализации внеклеточного матрикса, включая фибриллярный коллаген. Гиалуроновая кислота склеивает гранулы и депозиты структурирующихся кальцийфосфатов, способствует их росту и фиксации в зонах повышенных рисков механических напряжений. Это принципиально важный адаптивный механизм упрочнения сухожильной ткани, действующий на опережение.

*Ключевые слова:* перитенон, фибриллярный коллаген, остеоидные структуры, гиалуроновая кислота, сканирующая электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S0042132423040063, EDN: DGQCHN

### ВВЕДЕНИЕ

Сухожильная ткань – это переходная структура, которая занимает специализированные анатомические пространства между мышцами и костным остовом. Сухожилия призваны реагировать прежде всего на механические нагрузки. Именно поэтому сухожильная ткань филогенетически структурируется достаточно рано: впервые появляется у низших хордовых в виде миосепт (Gemballa et al., 2003). При нарастании мощности деформирующих нагрузок сухожилия оптимизируют соотношение жесткости и прочности локальным упрочнением коллагеновых фибрилл и отвердеванием экстрафибрилярного матрикса, образуя временные или постоянно присутствующие, в той или иной мере подвижные очаги кальцификации, формирующиеся в том числе и в составе остеоидных структур (Summers, Koob, 2002). В этом смысле остеоидные структуры сухожилий считают итогом

адаптивных модификаций, расширяющих способность реагировать на сжимающие и растягивающие силы путем последовательного приобретения дополнительных степеней свободы одно-, двух- и трехмерных массивов коллагеновых волокон. Так в процессе эволюции в одноосных сухожилиях, собранных в пучки, появляются многоосные оболочечные надстройки, предназначенные для дифференцированного реагирования на механические нагрузки.

Механобиологический посыл очевиден – сформировать композит, чувствительный к механическому напряжению, армированный фибриллярным коллагеном, с возможностями к механорецепции и структурированию внеклеточного матрикса в хондроидном и остеоидном направлениях (Lanir, 1978). Подобные структуры в сухожильной ткани известны: изучены, в частности, гистогенез, состав и морфологические проявления функциональной динамики сесамовидных островков – наиболее объемных компонентов хондро-остеоидных струк-

тур сухожилий (Гайдаш и др., 2022). Что касается данных о других остеоидных структурах и, прежде всего, об их феноменологических и терминологических определениях, а также морфологической классификации, то таковые в изученной литературе не найдены.

Тем не менее, эти сведения интересны не только для эволюционной биологии, но и для биотехнологии, так как сухожильную ткань широко используют в качестве сырья при получении коллагенсодержащих материалов. Не в полной мере ясны механизмы проникновения остеоидных структур, состояние и поведение в коллагенсодержащих продуктах. Однако их присутствие может быть как целевым компонентом (в остеоиндуктивных скаффолдах), так и попутным, но не всегда желательным. Например, остеоидные структуры в коллагеновых гелях, предназначенных для ожоговых ран, могут спровоцировать неуместную минерализацию и оссификацию струпа, что повысит неопределенность исходов его формирования.

Важным технологическим приемом считают добавление в коллагенсодержащие продукты гиалуроновой кислоты (ГК), известной своими водоудерживающими и структурообразующими свойствами. В частности, ГК увеличивает объем/поверхностное отношение, улучшает кондуктивность, увеличивает вязкость и создает предпосылки для колонизации стволовыми клетками композитов, повышает устойчивость коллагеновых белков к коллагеназам (Suh, Lee, 2002). Введенная в сухожилие в условиях *in vivo* ГК уменьшает сопротивление скольжению внутри коллагеновых волокон, стимулирует синтез фибриллярного коллагена, восстанавливает непрерывность и численную плотность коллагеновых волокон, подавляет в макрофагах синтез цитокинов и пролиферативную активность теноцитов (Huang-Lee et al., 1994; Anandagoda et al., 2012). Несмотря на обширность и многообразие вышеприведенных и аналогичных им исследований, все же основная их часть касается взаимоотношений ГК с коллагеном как с разновидностью фибриллярного протеина.

Гораздо менее изучено действие ГК на целостную сухожильную ткань. Кроме того, во многом остается непонятым и характер влияния ГК на остеоидные структуры сухожилий.

Ранее показано (Гайдаш и др., 2022), что приоритетным местоположением остеоидных структур в пространстве сухожильной ткани служат поверхностные слои коллагеновых массивов, граничащие с надкостницей прилежащих костных образований. Это одно из обстоятельств, которое предопределило выбор объекта данного исследования, а именно перитеноны – оболочечные структуры сухожильных пучков.

Другим мотивом в выборе объекта стало предположение о насыщенности перитенонов струк-

турными предикторами остеогенеза. Выдвижение гипотезы основано на анатомической близости перитенонов к надкостнице с ее мощным регенераторным потенциалом, структурные функционалы которой в ходе фило- и онтогенеза могли мигрировать в пограничные слои сухожильных пучков.

Понимание функционально-морфологических особенностей структурных предикторов остеогенеза в ходе реагирования на фармакологические агенты имеет значение при проектировании остеоиндуктивных или, наоборот, остеолитических коллагенсодержащих материалов. В связи с этим цель работы состоит в определении морфологических особенностей перитенонов паравертебральных сухожилий, обработанных ГК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучены перитеноны паравертебральных сухожилий, извлеченные из хвостов крыс линии Вистар. В эксперименте использовали половозрелых самцов с массой тела 250–300 г, выдержанных на сбалансированном рационе. Биопсию производили у крыс, наркотизированных этиловым эфиром. Протоколы эксперимента утверждены этическим комитетом Института физиологии НАН Беларуси и соответствовали Санитарным нормам 2.1.2.12-18-2006 (Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь. 2012. № 8/25189).

Исечение образцов произведено следующим образом: сепаровка кожи, круговой надрез связок, перелом и разделение позвоночного столба в средней части хвоста, извлечение из проксимального сегмента сухожильных пучков, продольное вскрытие сухожильной оболочки и отсечение свободных листков перитенонов. Данная техника позволяет выделять перитеноны без примеси костных компонентов надкостницы. Эксперимент выполнен в формате краткосрочных трехмерных органных культур, признанных стандартом исследований при тестировании фармакологических агентов. Для этого пластинки перитенонов размерами 3 × 5 мм инкубировали при температуре 37°C в 0.9%-ном водном растворе NaCl с добавлением канамицина в дозе 0.001 г/мл. ГК вводили в составе препарата Гилартен (S.C. Rompharm Company S.R.L., Romania), содержащего 2.0% ГК (M<sub>r</sub> ≈ 1–2 МДа) высокой степени очистки, без животных белков, стабилизированной 0.5%-ным раствором маннитола. Изучены следующие группы образцов: 1 – контроль; 2 – инкубация с ГК в течение 1 ч; 3 – инкубация с ГК до 2.5 сут.

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) образцы фиксировали на протяжении 3 сут в водном 3%-ном растворе глутарового альдегида, промывали в трех сменах дистиллированной воды, дегидратировали в водных растворах этанола восходящей концентрации и напыляли золотом

на установке K550X (Emitech, Great Britain). Морфологические исследования выполнены на сканирующем электронном микроскопе LEO 1420 (Carl Zeiss, Deutschland).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Контрольная группа*

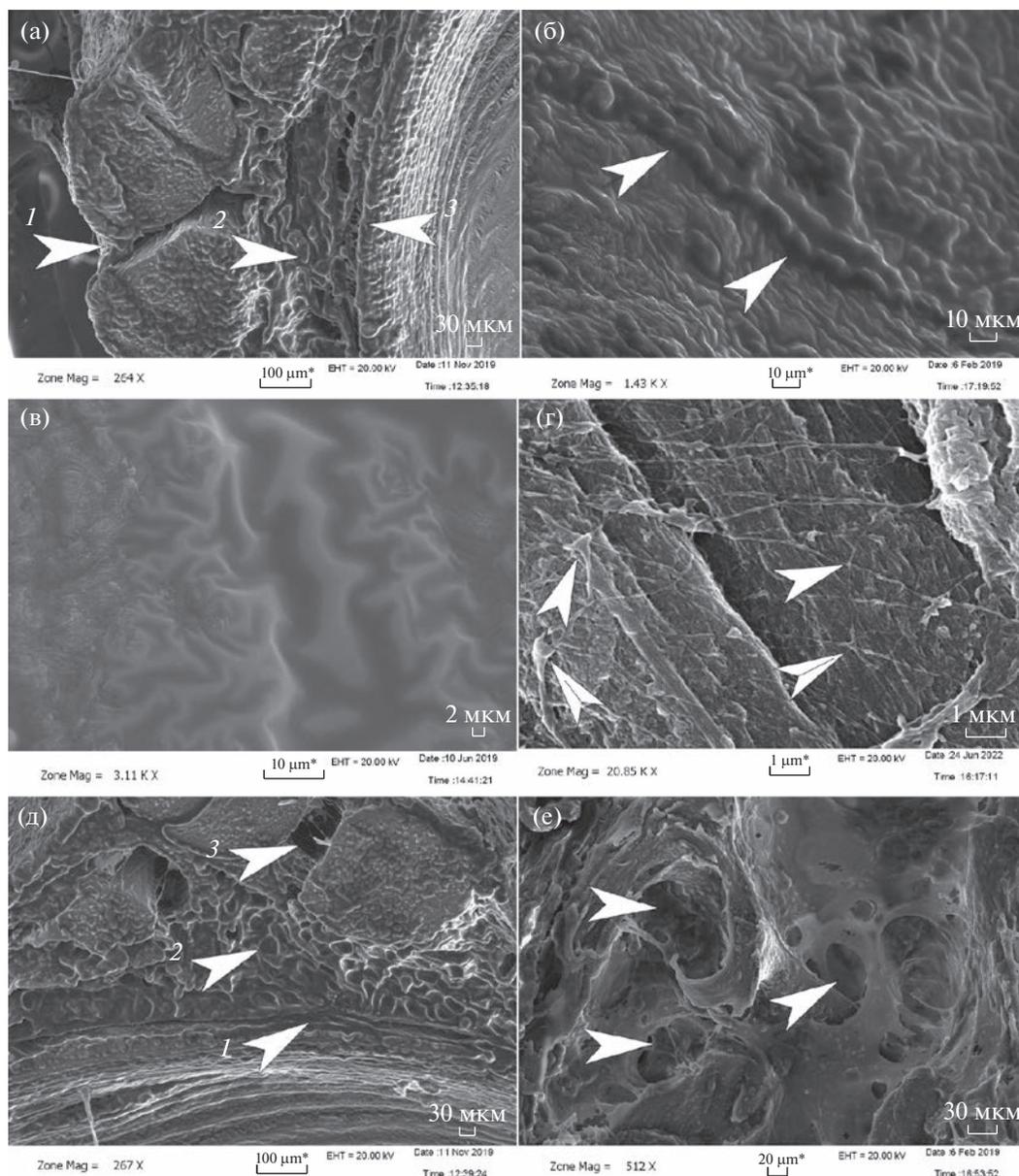
Перитенон — это капсула, вмещающая в себя продольные коллагеновые пучки (3–4 порядков), сшитые тонкими (1–2 порядков) волокнами поперечно-тангенциальной направленности. Анатомически выделяют два листка: наружный и внутренний.

Наружный — относительно равномерный тонкий листок, формирующий париетальную стенку капсулы перитенона, обращенную к кожному покрову (рис. 1а). Морфологически наружный листок составлен плотно упакованными пучками, организованными в параллельные блоки и ряды. По длинной оси пучки периодически расширяются и сужаются. Длина расширенного участка составляет 5.5 мкм, узкого — 3.0 мкм, доля расширенного участка относительно всей длины периода (в данном случае  $D = 8.5$  мкм) варьирует в пределах 0.64  $D$ . Поверхность в участках расширения гладкая, окатанная. На микрометровом уровне это придает текстуре пучков вид упорядоченной квазизернистости (рис. 1б). На субмикрометровом уровне в субфибриллах первого порядка толщиной 20–50 нм также выявлены периодичные расширения и сужения, обусловленные продольным сдвигом нитей тропоколлагена. Шаг периодов варьирует в пределах 64–67 нм, что характерно для доменной организации фибриллярного коллагена I типа. Совпадение численных значений структурных фракций не случайно и отражает доменную организацию фибриллярного коллагена I типа, проявляющуюся в фундаментальном соотношении 0.64  $D$  на всех уровнях организации коллагеновых волокон. В участках ремоделирования выявлены истонченные, с укороченными компонентами доменов (главный участок — 1.7 мкм, узкий — 2.3 мкм), уплощенные микрофибриллы с невидимой  $D$ -периодичностью. Волокна при этом изгибаются: угол изгиба между фибриллами варьирует в пределах  $14^\circ$ – $85^\circ$  (в среднем  $41^\circ$ ), принимают извилистый вид и уходят вглубь, образуя зигзагообразные Z-структуры (рис. 1в). Морфометрические показатели свидетельствуют о том, что эти волокна лишены атрибутивных размерных соотношений, что означает их структурную незрелость. В связи с этим, отметим полиморфизм очагов скопления Z-структур, вблизи которых накапливаются матриксные везикулы и рассеяны коллагеновые фибриллы разной степени структурной зрелости. Вышеприведенные количественно-морфологические показатели могут быть использованы в качестве

диагностических критериев целостности на уровне сухожильных пучков — по критериям размерных долей структурных фракций коллагеновых пучков и упорядоченности квазизернистости, на уровне субфибрилл при оценке регенераторной активности — по критериям местоположения и размерных параметров Z-структур. Коллагеновые волокна 2–4 порядков образуют субслои, между которыми расположены фибриллярные узлы. На СЭМ фибриллярные узлы имеют вид переброшенных субфибрилл. Размер центра сопряжения (собственно узла) варьирует от 0.139 до 0.662 мкм (в среднем  $0.324 \pm 0.03$ ), показатель  $r$  — число волокон, связанных с узлом, — варьирует от 3 до 5 ( $3.6 \pm 0.02$ ). Узлы расположены небольшими группами в изгибах коллагеновых пучков или образуют сети, охватывающие широкие пучковые массивы (рис. 1г). Некоторые узлы могут обжимать отдельные тяжи. Величины углов и длин обжимов различаются в разных слоях: чем глубже, тем меньше, что повышает отказоустойчивость конструкции. Главное предназначение фибриллярных узлов состоит в предотвращении избыточного рассеяния энергии, накопленной при растяжении/сжатии, а также при скручивании (Kastelic et al., 1978; Jansen et al., 2018).

Внутренний (дорзальный) листок имеет неравномерную толщину и обращен к позвоночному столбу, к надкостнице которого прикреплен посредством прерывистых поперечных микросвязок. Между внутренним листком и надкостницей позвонков сформировано щелевидное пространство, структурированное интерстициальными мембранами (рис. 1д). Морфологически интерстициальные мембраны — это перфорированные перегородки, образованные коллагеновыми волокнами первого порядка и расположенные в просветах интерстициальных щелей под острыми углами к их длинной оси. Толщина мембран не превышает 1.5–2.0 мкм, а диаметр пор, имеющих неправильную форму спавшихся отверстий, колеблется в пределах от 100 нм до 2–3 мкм. Интерстициальные пространства анастомозируют с каналами, расположенными между внутрикапсулярными пучками. В органных культурах перитенонов, выдержанных в физиологическом растворе в течение 2.5 сут, все поровые структуры резко расширены, соустья открыты, мембраны приподняты (рис. 1е). Это отражает регуляторный функционал сообщающихся интерстициальных пространств, структурирующих гидродинамические потоки в бессосудистом сухожилии.

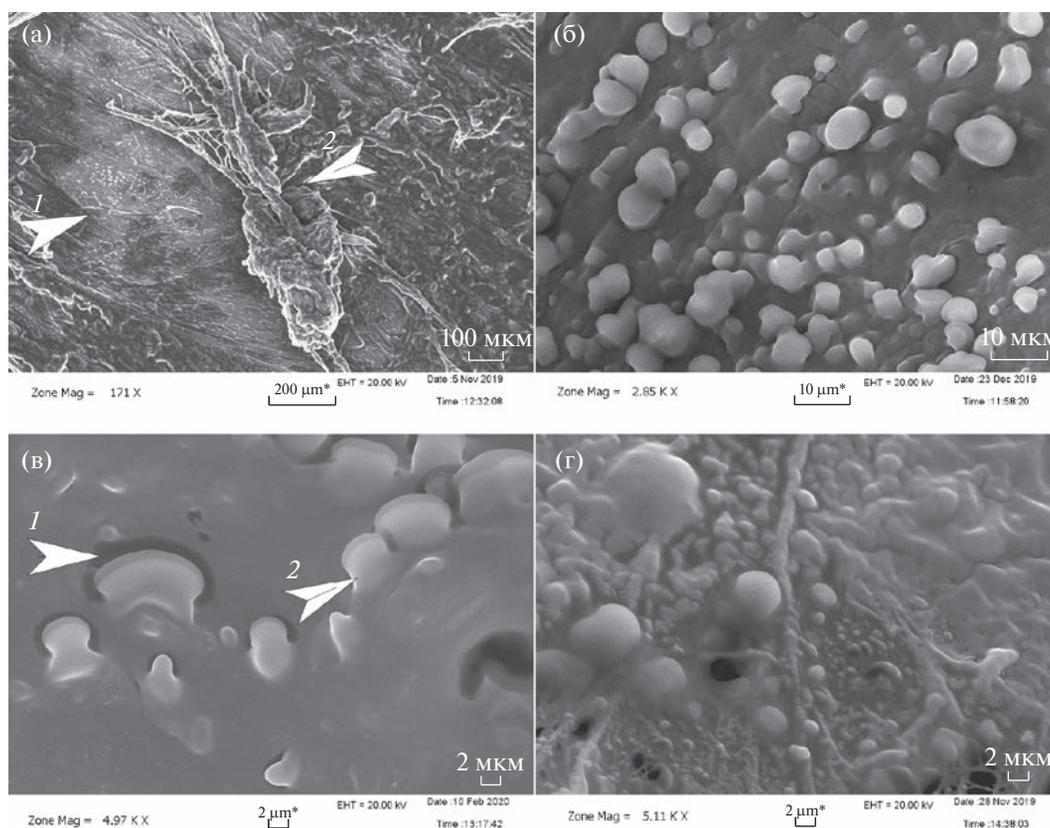
Наружный и дорзальный листки имеют промежуточную без резких границ прослойку рыхлой волокнистой ткани, которая посредством сети тонких волокон и фибриллярных узлов связана с внутрикапсулярными сухожильными пучками. Плотность взаимоприлегания волокон в промежуточной прослойке неравномерная: участки расправления



**Рис. 1.** СЭМ-изображения анатомических компонентов сухожилий контрольной группы: (а) стрелка 1 – наружный листок перитенона, стрелка 2 – внутренний листок, стрелка 3 – надкостница позвонка; (б) текстура поверхности коллагеновых пучков; (в) очаг ремоделирования коллагеновых фибрилл (Z-структуры); (г) сеть фибриллярных узлов; (д) структуры дорзального листка: стрелка 1 – интерстициальная щель между дорзальным листком перитенона и надкостницей позвонка, стрелка 2 – отросток эндотенона, стрелка 3 – интерстициальные каналы между пучками коллагеновых волокон; (е) расширенные интерстициальные каналы в перитеноне, инкубированном в биомиметической среде в течение 2.5 сут.

чередуются с очагами уплотнения. Сети пронизывающих тонких волокон и фибриллярных узлов формируют структуру подвижного каркаса, широкие пустоты которого заполнены компонентами экстрафибрилярного матрикса (теноцитами, матриксные везикулы, тканевой флюид и т.п.). Каркасная структура повышает прочность и устойчивость конструкции пограничной прослойки, но функционирование в режиме повышенных механических нагрузок увеличивает расход фибрил-

лярного протеина и стимулирует создание упрочняющих структур. Именно поэтому в промежуточных прослойках обоих листков перитенонов сосредоточены вышеописанные Z-структуры, количество которых закономерно возрастает по мере приближения очагов ремоделирования к надкостнице позвонков. Тренд на упрочнение поддерживает и оформление остеоидных структур в сесамовидные островки, игольчатые, стебельковые и пла-



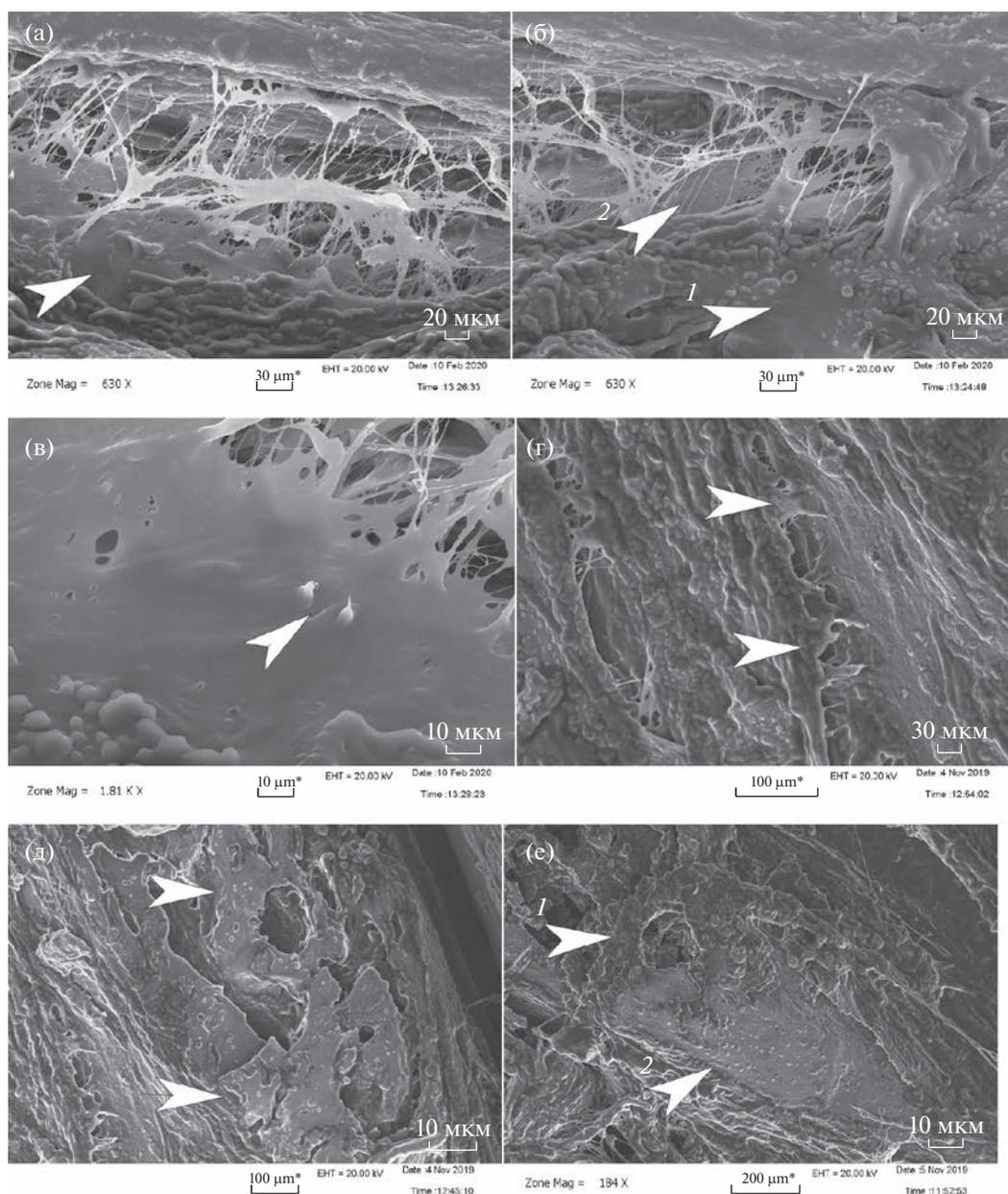
**Рис. 2.** СЭМ-изображения структур сесамويدного островка в перитеноне контрольной группы: (а) стрелка 1 – сесамويدный островок, стрелка 2 – отростчатый теноцит; (б) глобулы сесамويدного островка; (в) двухуровневая конструкция глобул сесамويدного островка, стрелка 1 – верхний уровень, стрелка 2 – нижний уровень; (г) текстура поверхности сесамويدного островка в области поры.

стинчатые разрастания, а также в остеоподобные образования.

СесамOIDные островки – это наиболее объемная разновидность остеOIDных структур перитенонов. Структурно островки имеют вид очагов уплотнения внеклеточного матрикса. В центре или в непосредственной близости от сесамOIDных островков расположены отростчатые теноциты (рис. 2а). Островки концентрируются преимущественно вблизи мягкой части энтез – костно-сухожильных переходов, распространяющихся в том числе и на дорзальные листки перитенонов. Предпочтительность данной локации не случайна: энтезы – это механосенситивные центры, регулирующие распределение механических напряжений (Benjamin et al., 2006). Важным компонентом островков являются сесамOIDные глобулы – овальные частицы диаметром 2–11 мкм ( $5.7 \pm 0.4$ ) (рис. 2б). Глобулы имеют двухуровневую структуру. Верхний уровень высотой 0.47–2.11 мкм ( $0.97 \pm 0.1$ ) прикрывает нижний слой в виде рыхлого чепчика. Нижний уровень высотой 1.4–5.2 мкм ( $3.3 \pm 0.3$ ) – плотный, однородный, погружен в разрыхленный подлежащий слой внеклеточного матрикса (рис. 2в). СесамOIDные глобулы имеют

клеточное происхождение, так как морфологически (структура поверхности оболочки), а также функционально (глобулы накапливаются в зонах ремоделирования) сходны с матриксными везикулами теноцитов, участвующих в процессах первичной минерализации регенерирующей хрящевой и костной тканей (Amizuka et al., 2012, 2014). По химическому составу содержимого сесамOIDные глобулы, по-видимому, близки к составу кальцийсфероидов – структур шаровидной формы, встречающихся в эпифизарной пластинке костно-хондральных соединений и участвующих в синтезе гидроксиапатита (Hasegawa et al., 2017). Основная часть сесамOIDных глобул расположена в поверхностных слоях островков преимущественно вблизи пор и лакун (рис. 2г). На территории одного островка может находиться несколько десятков сесамOIDных глобул, количество которых регулируется почкованием, сопровождающимся неравномерным распределением вещества.

Пластинчатые образования – это коллагеновые микрофибриллы, упакованные в пластинчатые структуры. Морфологически пластинчатые образования представляют собой тонкие, плотные в основаниях пластинки, располагающиеся в



**Рис. 3.** СЭМ-изображения пластинчатых, игольчатых и остеоноподобных структур перитенонов контрольной группы: (а) пластинчатые структуры; (б) многослойные пластинчатые структуры в межфибрилярном пространстве вблизи сесамовидного островка: стрелка 1 – сесамовидный островок, стрелка 2 – плотная пластинчатая структура; (в) клювовидные игольчатые разрастания; (г) стебельковые разрастания; (д) остеоноподобные структуры; (е) остеоноподобное разрастание, ассоциированное с сесамовидным островком (стрелки 1 и 2).

расширенных межфибрилярных пространствах (рис. 3а), ориентированных в основном вблизи сесамовидных островков (рис. 3б). Это обстоятельство позволяет признать данные образования структурными предикторами сесамовидных островков.

Игольчатые разрастания – это остроконечные выросты матрикса, напоминающие клювики, располагающиеся на поверхностях сесамовидных островков (рис. 3в) и коллагеновых фибрилл.

Стебельковые разрастания – это более крупные, ветвящиеся формы, часть которых имеет гаверсоподобные отверстия. Стебельковые разрастания преимущественно локализованы в глубоких слоях дорзальных листков перитенонов (рис. 3г).

Остеоноподобные структуры – это бесклеточные, слоистые (3–5 плотно склеенных слоев), отвердевшие образования, форма которых схожа с гистологической формой зрелых остеонов с характерным гаверсоподобным отверстием в цен-

тре, но без кровеносных сосудов и нервных стволов (рис. 3д). Некоторые остеоноподобные образования непосредственно контактируют с сесамовидными островками и с минерализованными коллагеновыми волокнами костно-сухожильных переходов (рис. 3е). В этих участках остеоноподобные структуры формируют разветвленные комплексы, схожие со спонгиозной костью.

#### *Влияние гиалуроновой кислоты на фибриллярный компонент перитенонов*

Коллагеновые фибриллы через час от начала обработки ГК покрываются тонкой гладкой пленкой, что свидетельствует о равномерном растекании тканевой жидкости по поверхности коллагеновых волокон (рис. 4а). Это значит, что ключевым морфогенетическим фактором, по крайней мере в ранние сроки действия агента, является последовательное снижение поверхностного натяжения, возможно, обусловленное адсорбцией ГК на белковые матрицы с образованием полярных покрытий типа пленок Ленгмюра (Nonogaki et al., 2000). В ходе растекания тканевой жидкости по поверхности D-периодичность (рис. 4б) и зигзагообразные структуры (рис. 4в) дезорганизируются, что создает предпосылки для затормаживания процессов ремоделирования коллагеновых волокон. При действии ГК в течение 18 ч тканевая жидкость становится более подвижной, и ее проникающая способность увеличивается. Об этом свидетельствуют данные СЭМ: доменная структура коллагеновых фибрилл разупорядочивается, значительная часть волокон сжимается, межфибрилярное пространство увеличивается, отдельные пучки рвутся, покрываются толстой пленкой (рис. 4г). Коллагеновый каркас разрыхляется, плотность упаковки волокон уменьшается. Этому может способствовать трансформация ГК в полугибкий полимер с разорванной и одновременно воссоздаваемой структурой водородных связей (Knill et al., 2002). Внеклеточный матрикс пронизывается тонкими (толщиной до 1.5 нм) волокнами без характерной для фибриллярного коллагена D-периодичности (рис. 4д). Возможно, это нити полимеризованной ГК, которая формирует разветвленные нитчатые перетяжки, фрагментирующие интерстициальное пространство. ГК уплотняет стенки расширенных интерстициальных каналов, к их поверхностям адгезируют сферические частицы ГК (рис. 4е). Рост пористости экстрафибрилярного матрикса, открытие пор интерстициальных мембран и уплотнение их стенок снижает пластичность в регулировании направленности и скорости тканевых гидродинамических потоков и разупорядочивает их.

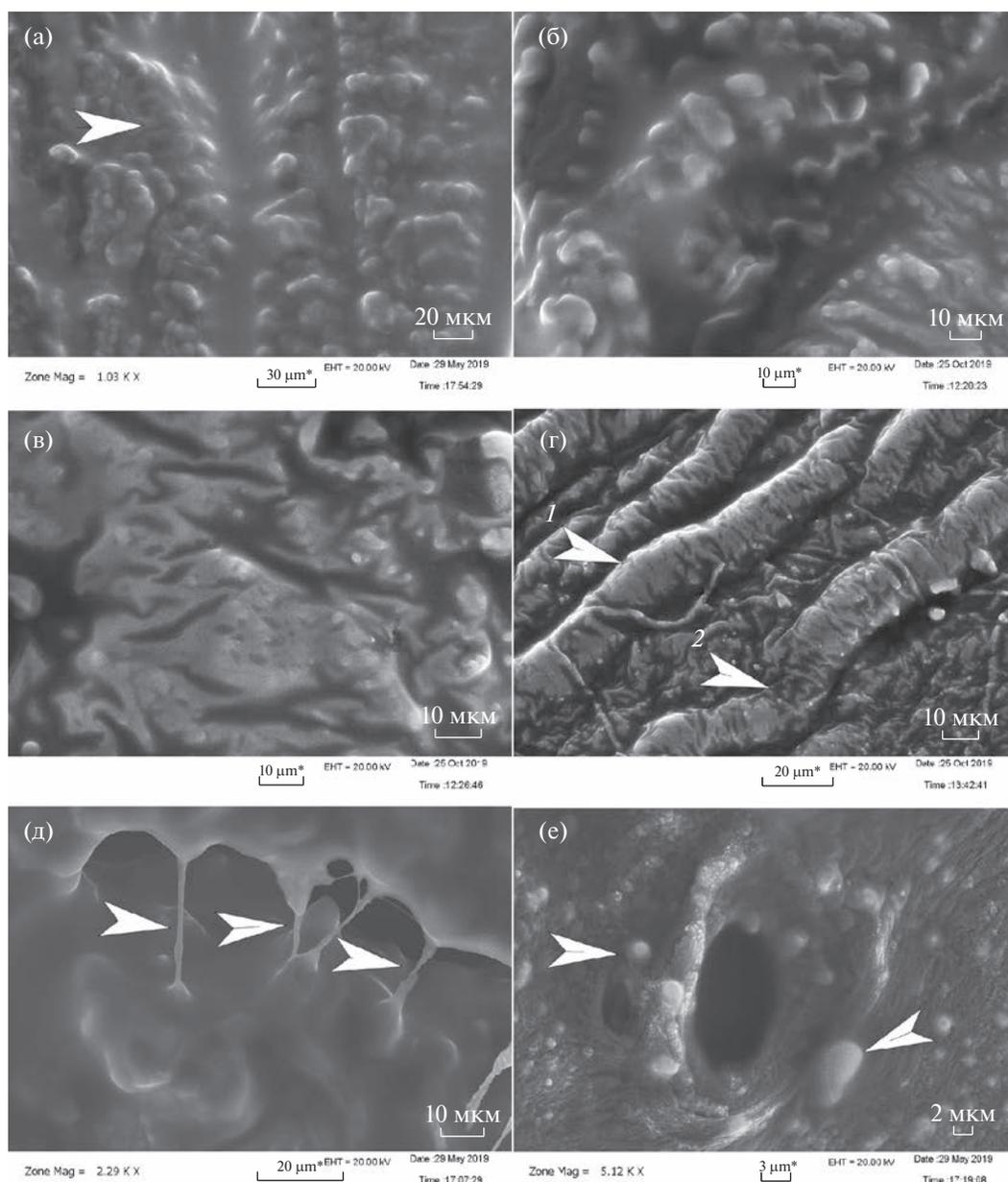
При увеличении продолжительности действия ГК до 2.5 сут проникающая способность интерстициального флюида возрастает. На СЭМ это верифицируют в виде проникновения тканевой жидкости в более глубокие слои коллагеновых пучков.

Практически речь идет об углублении сэндвич-эффекта, свидетельствующем о прогрессирующем понижении вязкости тканевой жидкости. Прогнозируемая причина этого состоит в длительной экспозиции при температуре 37°C, при которой удельная вязкость водных растворов ГК уменьшается примерно на 25% за счет сокращения гидродинамического радиуса, облегчения вращения связей между остатками сахара и, соответственно, увеличения гибкости первичных цепей ГК, а также динамического образования и разрыва водородных связей, снижения модуля упругости и укорочения полимерных цепей ГК (Hardingham et al., 2002; Hoefling et al., 2002). Влияние pH на вязкость ГК не столь однозначно: нейтральные водные растворы ГК затвердевают. При возрастании щелочного тренда до pH 8 (инкубация образцов осуществлена при pH 7.0–7.5) ГК подвергается существенным структурным преобразованиям: депротонируются карбоксильные группы, увеличивается скорость вращения глюкозидных остатков и рвутся водородные связи (Caspersen et al., 2014; Cowman et al., 2015; Gatej et al., 2015). В результате границы межфазовых интерфейсов разделяются и появляются предпосылки для усадки объема растворов ГК. На СЭМ регистрируют очаговые отслоения пленок, покрывающих коллагеновые фибриллы.

Отметим, что выбранная для эксперимента концентрация ГК (1 мг/мл), по-видимому, достаточно высокая, так как по данным СЭМ неколлагеновые нити запутываются, сворачиваются, скручиваются, сцепляются с коллагеновыми волокнами. Это свойственно концентрированным растворам ГК (Scott et al., 1991; Knepper et al., 1995). Вышеприведенные особенности свидетельствуют об интенсивных агрегационных и адгезионных взаимодействиях между волоконными компонентами интерстиция и переходными формами ГК.

#### *Влияние гиалуроновой кислоты на тканевой флюид перитенонов*

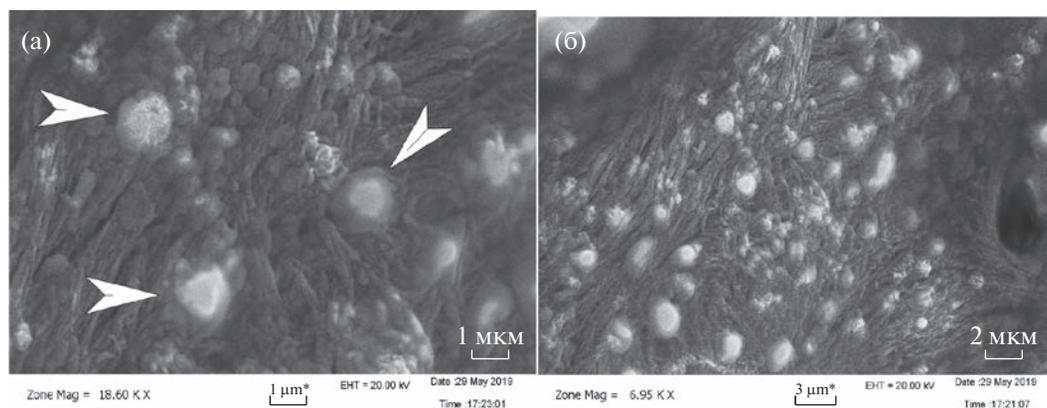
Во внеклеточном матриксе преимущественно в пограничной прослойке обоих листков перитенонов, обработанных ГК, присутствуют полиморфные частицы: разрозненные или агрегированные в ассоциаты диаметром 0.77–2.11 мкм (в среднем  $1.51 \pm 0.1$ ). Более крупные – частицы диаметром до 2.5 мкм преимущественно эллипсоидной формы с одним ядром, окруженным рыхлым гало (рис. 5а). Диаметр ядер варьирует в пределах 0.17–1.41 мкм ( $0.8 \pm 0.1$ ). Ядра в основном плотные, неоднородные, образованы слившимися мелкими гранулами. Некоторые ядра имеют мелкозернистую, сетчато-волоконистую структуру. Гало представляет собой бесструктурную субстанцию в виде оболочки толщиной 0.12–0.65 мкм ( $0.32 \pm 0.1$ ), более выраженную у эллипсоидных частиц. Края гало – разрыхленные с множественными тонкими выростами каймы. Наличие частиц, содержащих гало, свидетельствует о том, что в ранние



**Рис. 4.** СЭМ-изображения коллагеновых волокон и интерстициальных каналов в перитенонах, обработанных ГК в течение 1.0 ч, 2.0 сут и 2.5 сут: (а) тонкая пленка ГК, покрывающая коллагеновые волокна (1.0 ч); (б) дезорганизация доменной структуры в коллагеновых волокнах (1.0 ч); (в) дезорганизация Z-структур в очаге ремоделирования коллагеновых волокон (1.0 ч); (г) стрелка 1 – экранирование домена коллагенового волокна толстой пленкой ГК (2.5 сут), стрелка 2 – дефект в коллагеновой фибрилле (2.0 сут); (д) поперечные тонкие волокна в интерстиции (2.0 сут); (е) расширение интерстициального канала и адгезия глобул ГК к стенке каналов (1.0 ч).

сроки интервенции ГК подвержена трехмерной конформации преимущественно за счет гидратации. Механизм гидратации ГК известен – это образование водородных связей молекул воды с карбоксильным остатком глюкуроновой кислоты и формирование тандемных водных мостиков (Donati et al., 2001). ГК ведет себя как застывшая случайная катушка, окруженная слоистой гидратной оболочкой с неоднородной молекулярной динамикой: чем дальше от поверхности ГК, тем более

подвижны молекулы воды (Almond et al., 2006; Prusova et al., 2010). Структура гидратной оболочки в определенной мере подобна СЭМ-структуре вышеописанного гало – здесь также: чем дальше от ядер частицы, тем более лабильна фестончатая структура гало, кайма которой постепенно сливается с текстурой интерстициального флюида. Гало увеличивает подвижность частиц ГК: нано- и микроглобулы проникают в узкие межфибрилярные пространства, провоцируя очаговые разрушения (возможно,



**Рис. 5.** СЭМ-изображения глобул ГК в перитенонах, обработанных ГК в течение 1.0 ч: (а) структура эллипсоидных глобул с периферическим гало; (б) инфильтрация глобул ГК в межфибрилярные пространства.

по механизму расклинивающего эффекта) тонких (1–2 порядков) субфибрилл (рис. 5б).

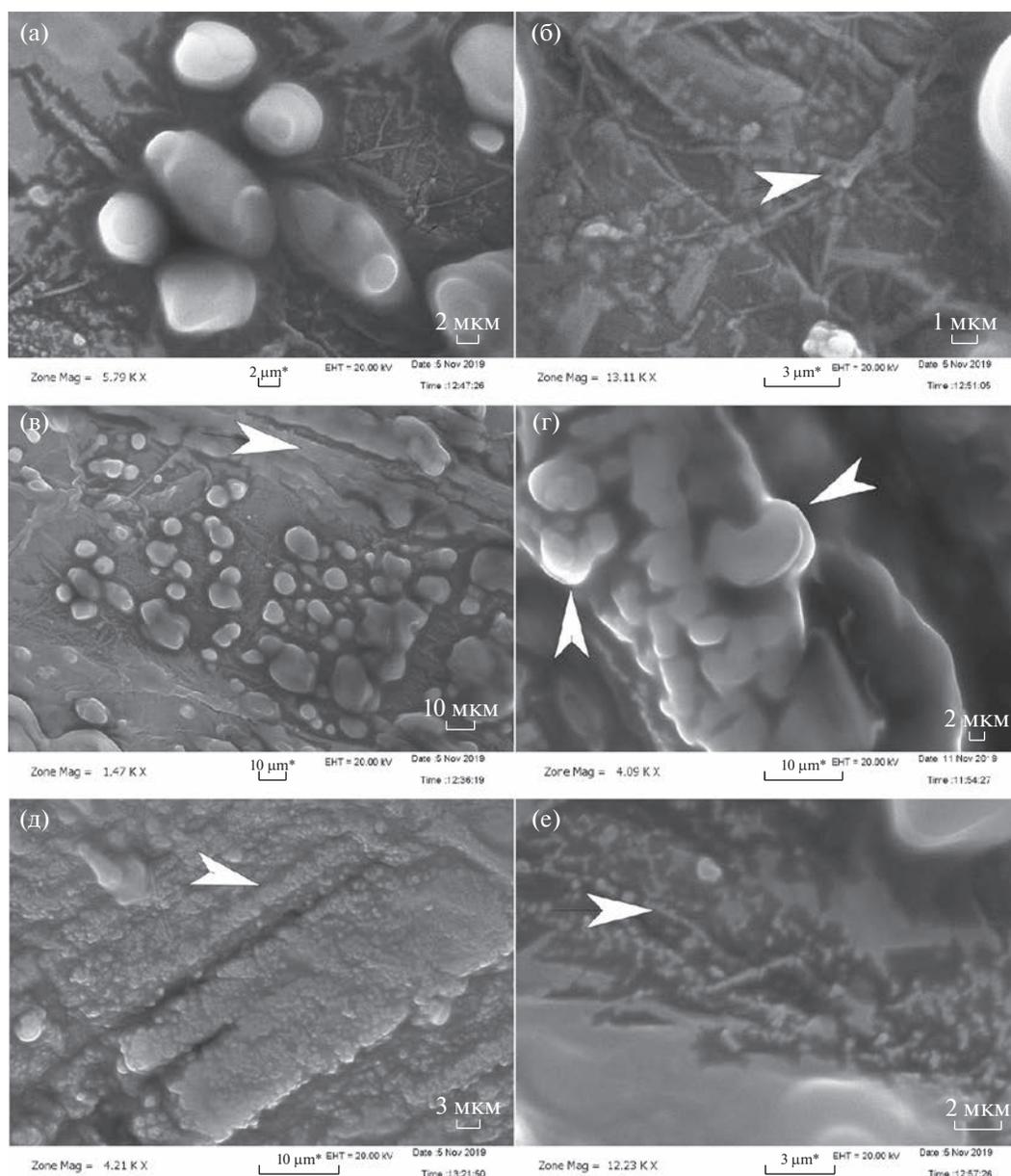
#### *Влияние гиалуроновой кислоты на остеоидные структуры*

**Сесамоидные островки.** Под воздействием ГК глобулы увеличиваются в размерах ( $8.8 \pm 0.7$  мкм) и почкуются (рис. 6а). Механизмы гипертрофии глобул неизвестны. По-видимому, ГК стимулирует метаболизм, сопровождающийся наращиванием массы глобул. На это указывает присутствие в большей части глобул внутренних точек роста, контурирующих на наружной поверхности глобулярной мембраны в виде набухающих почек. Вокруг глобул появляются зоны разрыхления и лизиса матрикса. Подобные литические разрыхления присутствуют и вне островкового матрикса и нередко в местах сосредоточения фибриллярных узлов, инфильтрированных сферическими частицами диаметром  $0.17\text{--}0.73$  мкм ( $0.37 \pm 0.04$ ). Частицы окружены гало, что придает им сходство с глобулами ГК (рис. 6б). В связи с разрыхлением утрачивается связь и усиливается подвижность глобул: они мигрируют в периферические участки островков и вторгаются в прилежащий экстрафибрилярный матрикс (рис. 6в), далее расселяются и вступают в адгезионные взаимоотношения с коллагеновыми волокнами (рис. 6г). Механизм деструкции оболочек глобул и матрикса сесамоидных островков не ясен. Морфологически лизис островкового матрикса имеет довольно типичную картину: на ранних стадиях – это эрозия поверхностного слоя (рис. 6д), позже возникают пустоты, содержащие детрит из частиц нерастворившихся коллагеновых фибрилл и остатков матрикса. При этом края пустот как бы изъедены, что характерно для ферментативного лизиса (рис. 6е). Одной из причин лизиса может быть активация щелочных фосфатаз, обусловленная механической нестабильностью глобул, испытывающих деформации

растяжения/сжатия внутриглобулярных потоков тканевой жидкости. Щелочная фосфатаза, как известно, посредством механочувствительных ионных каналов реагирует на механические напряжения, в том числе и вызванные пульсацией интерстициальной жидкости (Kraft et al., 2010; Wu et al., 2021). Не менее важна и другая причина активации разрушения матрикса сесамоидных островков, а именно способность ГК подавлять высвобождение протеогликанов из внутриклеточных сред (Shimazu et al., 1993). Однако протеогликаны, облигатно входящие в состав островкового матрикса, упрочняют его путем склеивания коллагеновых фибрилл. Учитывая это, логично ожидать, что локальный дефицит полисахаридов усугубит деструкцию островкового матрикса.

**Игольчатые и стебельковые разрастания.** Под воздействием ГК наблюдается уменьшение высоты клювовидных игольчатых разрастаний до  $2.1 \pm 0.1$  мкм (в контроле  $3.5 \pm 0.1$  мкм) и явное сужение их основания до  $1.6 \pm 0.1$  мкм (в контроле  $2.2 \pm 0.1$  мкм). При этом основная часть этой формы игольчатых разрастаний встречается на территории сесамоидных островков (рис. 7а). На остальном протяжении фибриллярного матрикса игольчатые разрастания клювовидной формы находятся под толстым слоем ГК, что делает их малозаметными. Стебельковые формы (рис. 7б) игольчатых разрастаний проявляют аналогичный тренд: укорачиваются до  $36.3$  мкм (в контроле  $49.3 \pm 2.4$  мкм) и истончаются до  $10.1 \pm 0.5$  (в контроле  $38.4 \pm 2.6$  мкм). Причиной субтрофических изменений игольчатых разрастаний может быть водоотнимающий эффект ГК. Это коррелирует с СЭМ-признаками поперечного сжатия (скручивание, изгибы) и сухого перелома в виде растрескивания оснований значительной части игольчатых разрастаний.

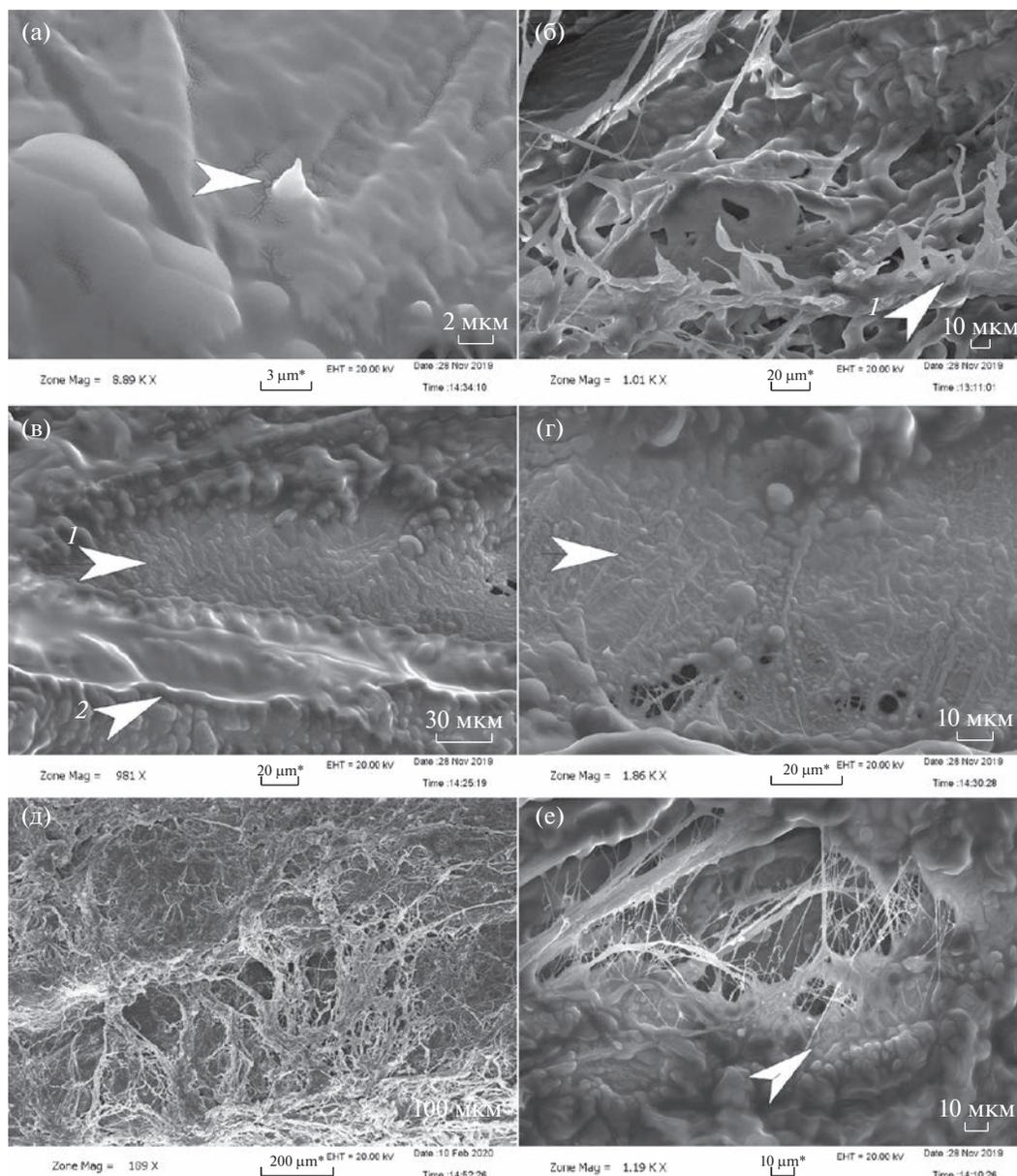
**Пластинчатые структуры.** При воздействии ГК усиливается компактизация коллагеновых во-



**Рис. 6.** СЭМ-изображения сезамовидных структур в перитенонах, обработанных ГК в течение 2.5 сут: (а) крупные, почкующиеся сезамовидные глобулы; (б) фибриллярный узел в зоне лизиса матрикса сезамовидного островка; (в) миграция сезамовидных глобул в экстрафибриллярный матрикс; (г) адгезия сезамовидных глобул к коллагеновым волокнам; (д) поверхностное эрозирование матрикса сезамовидного островка; (е) участок ферментативного лизиса матрикса сезамовидного островка.

локон, что проявляется при действии агента более 24 ч. Процессы компактизации затрагивают структуры, находящиеся вблизи, прежде всего, сезамовидных островков. Коллагеновые волокна, окаймляющие островки, покрыты толстой гиалуроновой пленкой с признаками усадки в виде сжатия и очагового отслаивания (рис. 7в). Текстура островкового матрикса разрыхляется, обнажаются ветвящиеся фибриллы с характерной для фибриллярного коллагена периодичностью, и открываются поры (рис. 7г). Волокна в периостров-

ковых регионах утолщаются и компактизируются, переплетения уплотняются (рис. 7д). Межфибрилярные пространства расширены, пронизаны склеенными коллагеновыми субфибриллами, местами формирующими тонкую, прозрачную пленку, более характерную для зарождающихся сезамовидных островков (рис. 7е). Механизмы компактизации коллагеновых волокон при длительном действии ГК, вероятно, обусловлены кислотной деградацией ГК, уменьшением ее молекулярной массы и числа структурных субъединиц (Mikel-



**Рис. 7.** СЭМ-изображения пластинчатых, игольчатых и остеоноподобных структур в перитенонах, обработанных ГК в течение 2.5 сут: (а) клювовидные игольчатые разрастания; (б) стебельковые разрастания; (в) сесамовидный островок и фибриллярный коллаген: стрелка 1 – сесамовидный островок, покрытый ГК, стрелка 2 – коллагеновое волокно, покрытое толстой пленкой ГК; (г) текстура матрикса сесамовидного островка; (д) компактизация коллагеновых волокон в каркасе перитенона; (е) компактизация коллагеновых волокон в зарождающемся сесамовидном островке.

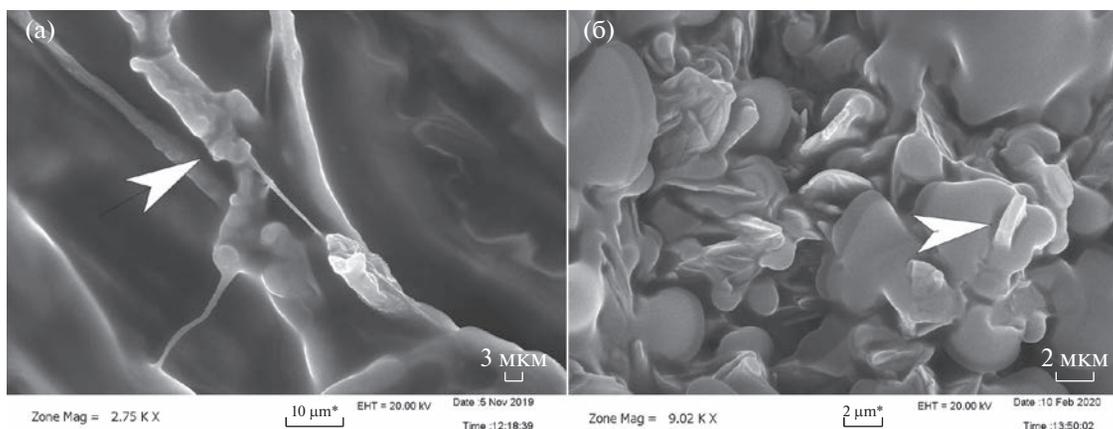
saar, Scott, 1994; Frayssinet et al., 2018). Компактизация коллагеновых фибрилл – это ключевой механизм ламеллярной трансформации фибриллярного каркаса перитенонов, который на молекулярном уровне, возможно, контролирует структурно-массовые переходы между третичными структурами (бета-листами) ГК и двойными спиралями полипептидных цепей фибриллярного коллагена (Mikelsaar, Scott, 1994).

**Остеоноподобные образования.** Наружный слой остеонив покрывается пленкой ГК, на которой рас-

положены сесамовидные глобулы. Данный эффект, возможно механический, так как значительная часть сесамовидных островков является анатомической частью остеоноподобных образований.

#### *Влияние гиалуроновой кислоты на морфологические проявления структурирования кальцийфосфатов*

По данным СЭМ, структурирующиеся кальцийфосфаты присутствуют в двух морфологических формах: микрогранулах и ограненных депозитах.



**Рис. 8.** СЭМ-изображения структурированных кальцийфосфатов в перитенонах, обработанных ГК в течение 2.5 сут: (а) гранулы кальцийфосфатов на поверхностях коллагеновых волокон; (б) депозиты на поверхности сесамовидных глобул.

Микрогранулы размером 10–15 нм расположены внутри или на поверхности коллагеновых фибрилл. Присутствие микрогранул считают проявлением гетерогенной нуклеации кальцийфосфатов, осуществляемой на матрицах коллагеновых волокон (Landis, Silver, 2009). Объективно это визуализируется отложениями микрогранул на поверхностях субфибрилл преимущественно пластинчатых предикторов сесамовидных островков. На ранних стадиях частицы структурирующихся кальцийфосфатов осаждаются в просветах интердигитирующих каналов коллагеновых микрофибрилл (Nudelman et al., 2010). В образцах 1-й группы (по условиям эксперимента в ситуации относительного физиологического покоя) гранулы симметрируют застывшее состояние: гранулы симметричны, короткие оси преимущественно перпендикулярны длинным осям коллагеновых фибрилл, упорядочены по размерам и форме, стремящейся к сфероидам. В состоянии, возмущенном действием ГК (образцы 3-й группы с продолжительностью действия ГК до 2.5 сут), микрогранулы проявляют признаки роста: увеличиваются преимущественно по коротким осям, центры частиц асимметрично смещены, не строго перпендикулярны длинным осям коллагеновых субфибрилл, микрогранулы разноразмерны, пространственно разупорядочены. По мере роста структурный полиморфизм микрогранул нарастает, они склеиваются и их агрегаты захватывают внешние поверхности фибрилл. Микрогранулы кристаллизуются (о чем свидетельствует появление граней) и адгезируют к поверхностям коллагеновых фибрилл, преимущественно в участках их бифуркации (рис. 8а).

Депозиты — это ограниченные частицы микрогранул, которые в процессе роста прободают сесамовидные глобулы и фиксируются на наружной поверхности глобулярных мембран. В образцах 1-й группы депозиты остроконечны, имеют ши-

рокое основание. В образцах 3-й группы супраглобулярные депозиты увеличиваются преимущественно по длинным осям и приобретают форму хорошо ограниченных параллелепипедов (рис. 8б). Если исходить из того, что сесамовидные глобулы являются предшественниками матричных везикул, содержащих химические прекурсоры гидроксиапатита, можно с уверенностью полагать, что массовое прораствание глобул депозитами свидетельствует об усилении процессов структурирования кальцийфосфатов по механизму гомогенной нуклеации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Остеоидные структуры перитенонов подразделяют на персистирующие и перманентные. Персистирующие остеоидные структуры — сесамовидные островки и их пластинчатые предикторы, игольчатые разрастания, рудименты остеонов. Фундаментальное свойство персистирующих остеоидных структур — высокая чувствительность к остеоиндуктивным стимулам и структурно-функциональная готовность к трансформациям, направленным на упрочнение внеклеточного матрикса перитенонов. Объем персистирующих остеоидных структур определяется интенсивностью механических нагрузок: при повышении нагрузок — может увеличиться, при снижении — уменьшиться. Перманентные остеоидные структуры — это микрогранулы и ограниченные депозиты кальцийфосфатов. Атрибутивное предназначение перманентных остеоидных структур — участие в структурно-метаболических процессах гетеро- и гомогенной нуклеации кальцийфосфатов, структурирующихся в гидроксиапатит.

При взаимодействии с фибриллярным коллагеном ГК усиливает агрегацию и компактизацию коллагеновых фибрилл, ускоряет образо-

вание пластинчатых предикторов сесамовидных островков, экранирует поверхность волокон и разделяет границы межфазовых интерфейсов. Глобулы ГК проникают в межфибрилярные пространства, расслаивают коллагеновые пучки и разрушают субфибриллы.

Гиалуроновая кислота способствует разрыхлению матрикса сесамовидных островков, что увеличивает их подвижность и создает предпосылки для миграции сесамовидных глобул в зоны повышенной механической нагрузки с последующей минерализацией внеклеточного матрикса, включая фибриллярный коллаген. ГК склеивает микрогранулы и депозиты кальцийфосфатов, структурирующиеся в гидроксипатит, способствует их росту и фиксации в зонах повышенных рисков механических напряжений. Это принципиально важные адаптивные механизмы упрочнения сухожильной ткани, действующие на опережение. Выявленные свойства ГК в отношении остеоидных структур перитенонов расширяют возможности применения данного агента в биотехнологических разработках с использованием сухожильной ткани.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований “Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорхимия” по заданию 2.1.04.7 на 2021–2025 гг.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием людей авторы не проводили. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием животных, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации о биоэтике и правах человека (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 2013).

#### СПИСОК ЛИТЕАТУРЫ

Гайдаш А.А., Крутько В.К., Блинова М.И. и др. Структура и физико-химические свойства паравертебральных сухожилий // Цитология. 2022. Т. 64. № 3. С. 249–261.

Almond A., Deangelis P.L., Blundell C.D. Hyaluronan: the local solution conformation determined by NMR and computer modeling is close to a contracted left-handed 4-fold helix // J. Mol. Biol. 2006. V. 358 (5). P. 1256–1269.

Amizuka N., Hasegawa T., Oda K. et al. Histology of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification // Front. Biosci. 2012. V. 4 (6). P. 2085–2100.

Amizuka N., Hasegawa T., Yamamoto T., Oda K. Microscopic aspects on biomineralization in bone // Clin. Calcium. 2014. V. 24 (2). P. 203–214.

Anandagoda N., Ezra D.G., Cheema U. et al. Hyaluronan hydration generates three-dimensional meso-scale structure in engineered collagen tissues // J. R. Soc. Interface. 2012. V. 9 (75). P. 2680–2687.

Benjamin M., Toumi H., Ralphs J.R. et al. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites (‘entheses’) in relation to exercise and/or mechanical load // J. Anat. 2006. V. 208. P. 471–490.

Caspersen M.B., Roubroeks J.P., Qun L. et al. Thermal degradation and stability of sodium hyaluronate in solid state // Carbohydr. Polym. 2014. V. 107. P. 25–30.

Cowman M.K., Schmidt T.A., Raghavan P., Stecco A. Viscoelastic properties of hyaluronan in physiological conditions // F1000Res. 2015. V. 4. P. 622–634.

Donati A., Magnani A., Bonechi C. et al. Solution structure of hyaluronic acid oligomers by experimental and theoretical NMR, and molecular dynamics simulation // Biopolymers. 2001. V. 59 (6). P. 434–445.

Frayssinet A., Petta D., Eglin D. et al. Development of collagen/hyaluronic acid-tyramine (COLL/THA) composite hydrogels with tunable gelling kinetic and THA content for the treatment of nucleus pulposus // Orthopaedic Proc. 2018. V. 100-B (14). P. 96.

Gatej I., Popa M., Rinaudo M. Role of the pH on hyaluronan behavior in aqueous solution // Biomacromolecules. 2015. V. 6 (1). P. 61–67.

Gemballa S., Ebmeyer L., Hagen K. et al. Evolutionary transformations of myoseptal tendons in gnathostomes // Proc. Biol. Sci. 2003. V. 270. P. 1229–1235.

Hardingham T., Heng B.C., Gribbon P. Analysis of the concentrated solution properties of hyaluronan by confocal-frap show no evidence of chain-chain association // Hyaluronan / Proc. Int. Meet. (September 2000, North East Wales Institute). Cambridge: Woodhead Publ. Ltd., 2002. V. 1. P. 123–136.

Hasegawa T., Yamamoto T., Tsuchiya E. et al. Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization // Jpn. Dent. Sci. Rev. 2017. V. 53. P. 34–45.

Hoefling J.M., Cowman M.K., Matsuoka S., Balazs E.A. Temperature effect on the dynamic rheological characteristics of hyaluronan, hylan A and synvisc // Hyaluronan / Proc. Int. Meet. (September 2000, North East Wales Institute). Cambridge: Woodhead Publ. Ltd., 2002. V. 1. P. 103–108.

Huang-Lee L.L., Wu J.H., Nimni M.E. Effects of hyaluronan on collagen fibrillar matrix contraction by fibroblasts // J. Biomed. Mater. Res. 1994. V. 28 (1). P. 123–132.

Jansen K.A., Licup A.J., Sharma A. et al. The role of network architecture in collagen mechanics // Biophys. J. 2018. V. 114. P. 2665–2678.

Kastelic J., Galeski A., Baer E. The multicomposite structure of tendon // Connect. Tiss. Res. 1978. V. 6. P. 11–23.

- Knepper P.A., Covici S., Fadel J.R. et al.* Surface-tension properties of hyaluronic acid // *J. Glaucoma*. 1995. V. 4 (3). P. 194–199.
- Knill C.J., Kennedy J.F., Latif Y., Ellwood D.* Effect of metal ions on the rheological flow profiles of hyaluronate solutions // *Hyaluronan / Proc. Int. Meet. (September 2000, North East Wales Institute)*. Cambridge: Woodhead Publ. Ltd., 2002. V. 1. P. 175–180.
- Kraft D., Bindslev D., Melsen B. et al.* Mechano-sensitivity of dental pulp stem cells is related to their osteogenic maturity European // *Eur. J. Oral Sci.* 2010. V. 118 (1). P. 29–38.
- Landis W.J., Silver F.H.* Mineral deposition in the extracellular matrices of vertebrate tissues: identification of possible apatite nucleation sites on type I collagen // *Cells Tiss. Organs*. 2009. V. 189. P. 20–24.
- Lanir Y.* Structure-strength relations in mammalian tendon // *Biophys. J.* 1978. V. 24. P. 541–554.
- Mikelsaar R.H., Scott J.E.* Molecular modelling of secondary and tertiary structures of hyaluronan, compared with electron microscopy and NMR data. Possible sheets and tubular structures in aqueous solution // *Glycoconj. J.* 1994. V. 11 (2). P. 65–71.
- Nonogaki T., Xu S., Kugimiya S.M. et al.* Two dimensional auto-organized nanostructure formation of hyaluronate on bovine serum albumin monolayer and its surface tension // *Langmuir*. 2000. V. 16 (9). P. 4272–4278.
- Nudelman F., Pieterse K., George A. et al.* The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors // *Nat. Mater.* 2010. V. 9. P. 1004–1009.
- Prusova A., Šmejkalová D., Chytil M. et al.* An alternative DSC approach to study hydration of hyaluronan // *Carbohydr. Polymers*. 2010. V. 82 (2). P. 498–503.
- Scott J.E., Cummings C., Brass A., Chen Y.* Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer // *Biochem. J.* 1991. V. 274. P. 699–705.
- Shimazu A., Jikko A., Iwamoto M. et al.* Effects of hyaluronic acid on the release of proteoglycan from the cell matrix in rabbit chondrocyte cultures in the presence and absence of cytokines // *Arthritis Rheum.* 1993. V. 36 (2). P. 247–253.
- Suh H., Lee J.E.* Behavior of fibroblasts on a porous hyaluronic acid incorporated collagen matrix // *Yonsei Med. J.* 2002. V. 43 (2). P. 193–202.
- Summers A.P., Koob T.J.* The evolution of tendon – morphology and material properties // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2002. V. 133. P. 1159–1170.
- Wu T., Yin F., Wang N. et al.* Involvement of mechanosensitive ion channels in the effects of mechanical stretch induces osteogenic differentiation in mouse bone marrow mesenchymal stem cells // *J. Cell. Physiol.* 2021. V. 236 (1). P. 284–293.

## Structure of the Peritenons of the Paravertebral Tendons Treated by Hyaluronic Acid

A. A. Gaidash<sup>a</sup>, \*, V. K. Krut'ko<sup>a</sup>, A. I. Kulak<sup>a</sup>, O. N. Musskaya<sup>a</sup>,  
K. V. Skrotskaya<sup>b</sup>, Yu. P. Tokalchik<sup>c</sup>, and V. A. Kulchitsky<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*Institute of General and Inorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

<sup>b</sup>*Research Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk, Belarus*

<sup>c</sup>*Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

\*e-mail: algaidashspb@gmail.com

The tendon sheaths (peritenones) of the paravertebral tendons of the tails of Wistar rats were studied using scanning electron microscopy. A phenomenological classification of the osteoid structures of the peritenons is given, with the identification of their persistent and permanent varieties. Sesamoid islets, needle-like and lamellar growths, rudiments of osteons are classified as persistent. Persistent osteoid structures are well prepared for transformations aimed at strengthening the intracellular matrix under mechanical stress. Permanent osteoid structures are microgranules and faceted deposits of calcium phosphates involved in structural and mechanical processes, hetero- and homogeneous nucleation. Hyaluronate loosens the matrix of sesamoid islets, which increases the mobility of sesamoid globules and creates the prerequisites for their directed migration to areas of increased mechanical stress and foci of possible mineralization of extracellular substance, including fibrillar collagen. Hyaluronate sticks together granules and deposits of structured calcium phosphates. contribute to their growth and fixation in areas of increased risk of mechanical stress. This is a fundamentally important adaptive mechanism for strengthening the tendon tissue, acting in advance.

**Keywords:** peritenon, fibrillar collagen, osteoid structures, hyaluronic acid, scanning electron microscopy

УДК 612.115.3

## СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ГЕПАРИНОВ ЖИВОТНОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 2023 г. М. С. Успенская<sup>1</sup>, Л. А. Ляпина<sup>1</sup> \*,  
С. М. Сороколетов<sup>2</sup>, М. Г. Ляпина<sup>1</sup>, М. Д. Калугина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, Москва, Россия

<sup>2</sup>Городская клиническая больница им. С.П. Боткина, Москва, Россия

\*e-mail: lyapinal@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2023 г.

После доработки 05.03.2023 г.

Принята к публикации 05.03.2023 г.

Получены комплексные средства на основе гепаринов животного и растительного происхождения с включением в их состав глутаминовой кислоты в весовом соотношении 1 : 4. В качестве гепаринов животного происхождения использовали коммерческие препараты высокомолекулярного и низкомолекулярного гепаринов (ВМГ и НМГ). В качестве гепарина растительного происхождения применяли гепариноид, выделенный из корней пиона Академик Садовничий. Изучали их влияние на состояние плазменного гемостаза в условиях *in vitro* в сравнительном аспекте. Установлено, что все комплексные соединения обладают антикоагулянтной активностью, которая, по результатам наших исследований, реализуется разными механизмами их действия на свертывание крови – на внутренний, внешний или общий пути свертывания крови. Комплексы ВМГ с глутаминовой кислотой обладают антитромбиновым эффектом, влияя на внутренний и общий пути свертывания. Комплексы НМГ с глутаминовой кислотой, демонстрируя анти-Ха-активность, влияют на внутренний путь активации свертывания. Соединение гепариноида с глутаминовой кислотой ингибирует факторы не только внутреннего, но и внешнего путей свертывания крови. Кроме того, последнее соединение проявляет слабую антитромбиновую активность. Показано также, что все комплексы гепаринов препятствуют полимеризации фибрина, усиливая фибриндеполимеризационную активность плазмы, причем в гепариноидном соединении, по сравнению с другими коммерческими средствами, эта активность была выше на 10–17%. Таким образом, наилучшим по эффективности и безопасности противосвертывающим средством является гепариноидный комплекс с глутаминовой кислотой.

**Ключевые слова:** гепарины высоко- и низкомолекулярные, гепариноид из корней пиона, комплексы гепарина с глутаминовой кислотой, антикоагулянтная активность, полимеризация фибрина

**DOI:** 10.31857/S0042132423040105, **EDN:** FHUQAH

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что все гепарины в той или иной степени проявляют антикоагулянтный эффект (Onishi et al., 2016; Beurskens et al., 2020). В то же время высокомолекулярный (ВМГ) или нефракционированный гепарин обладает рядом нежелательных побочных свойств, которые в основном предопределены его структурой. ВМГ представляет собой смесь кислых макромолекулярных цепей сульфатированных анионов гликозаминогликанов с высоковариабельной молекулярной массой от 6 до 40 кДа. Основные эффекты ВМГ – антитромбиновый и антитромбопластиновый. Это обусловлено взаимодействием комплекса гепарин–антитромбин III с тромбином и рядом факторов свертывания (Ха, XIIa, XIa, IXa). Для ингиби-

рования тромбина необходимы, как минимум, 18 сахарных остатков в молекуле гепарина, что возможно при его молекулярной массе не менее 5.5 кДа. Соотношение у ВМГ анти-IIa- и анти-Ха-активности составляет 1 : 1. Благодаря гетерогенности структуры ВМГ биодоступность его равна 30%, поскольку он взаимодействует как с белками, так и с клетками (крови, эндотелия и т.д.). Антигепариновый фактор 4 тромбоцитов, ингибируя гепарин, может вызвать гепариновую иммунную тромбоцитопению из-за образования антител к этому комплексу и привести к тромбозу. Кроме того, нежелательным эффектом ВМГ при его длительном и частом применении в больших дозах служит истощение антитромбина III, а это в свою очередь также может вызвать гиперкоагуляцию (Берковский и др., 2015; Marbet, 2003). Из-

вестно также, что низкомолекулярный гепарин (НМГ) обладает антифакторной Ха-активностью и не ингибирует тромбин (Берковский и др., 2015). В то же время гепариноиды из пионов (древовидного, Млокосевича, молочнокветкового и др.), включая низкомолекулярные фракции гепарина, как и коммерческий НМГ, могут проявлять антифакторную Ха-активность (Ляпина и др., 2016).

Применение фармакологических гепариновых препаратов, в том числе и с включением аминокислот, — практика, используемая на протяжении последних десятилетий специалистами различных направлений. Известно, что аминокислоты выполняют роль нейромедиаторов, способствуют адекватной реализации функций макро- и микроэлементов (Стручкова, Брилкина, 2016), поэтому их взаимодействие с гепаринами обычно приводит к дополнительным положительным эффектам. Показано, что глутаминовая кислота (ГК) активно связывается с гепарином, образуя соединение, которое при пероральном введении в организм проявляет антикоагулянтные эффекты (Николаева, Ляпина, 2019). Эта аминокислота участвует в белковом и углеводном обмене, стимулирует окислительные процессы, а также в азотистом обмене, способствуя обезвреживанию аммиака. В медицинской практике она в основном находит применение при заболеваниях ЦНС.

Нормальный гемостаз обеспечивается регуляторными взаимоотношениями свертывающей и противосвертывающей систем крови (Кузник, 2010; Ляпина и др., 2012). В случае нарушения этих взаимоотношений возможно возникновение тромботических осложнений. Для борьбы с ними в настоящее время используют препараты НМГ, которые относительно безопасны и не вызывают кровоточивости при передозировке (Кричевский, 2015). Получают эти препараты или путем деполимеризации ВМГ животного происхождения или непосредственно из тканей животных (свиней, крупного рогатого скота). Обычно препараты НМГ применяют подкожно или внутривенно (Xiao et al., 2016). Значительный интерес представляет поиск пероральных препаратов растительной природы. Известно, что многие растения служат источником лекарственного сырья для получения антикоагулянтов, фибринолитиков и тромболитиков (Li et al., 2012; Wu et al., 2015; Zhang, 2016).

Некоторые растения содержат компоненты, являющиеся составной частью гепарина и других гликозаминогликанов (Кузнецова и др., 2010). В корнях травянистых пионов обнаружено гепариноподобное вещество, оказывающее антикоагулянтные эффекты в исследованиях *in vitro* и при внутривенном введении животным (Ляпина и др., 2016). В настоящее время препаратам НМГ отводится особая роль, поскольку они применяются для борьбы с тромбозами при COVID-19. Поэтому разработка препаратов НМГ разной природы

без побочных отрицательных эффектов на организм человека приобретает в настоящее время особую актуальность.

Цель настоящей работы — создать средства на основе гепаринов животного и растительно-го происхождения совместно с ГК, изучить их влияние на свертывание крови в сравнительном аспекте и выявить наиболее эффективное по противосвертывающим свойствам соединение гепарина с ГК в условиях *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали животных, которых выращивали в питомнике станции Столбовой Московской обл. Пушкинского р-на — здоровых крыс-самцов линии Вистар массой тела 220–250 г. До начала экспериментов и в период проведения опытов крысы находились на обычном лабораторном рационе и содержались в стандартных условиях вивария (искусственное освещение день/ночь — 12/12 ч, принудительная вентиляция, температура 22–26°C, относительная влажность 50–70%) со свободным доступом к воде и пище. Все эксперименты на животных осуществлялись в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 15.06.2006), Базельской декларацией и Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным.

Сырьем для получения гепариноидов служили корни пионов, которые получены из экологически чистых растений, произрастающих в Ботаническом саду МГУ (Москва, Россия). Виды пионов определяли сотрудники Ботанического сада МГУ под руководством М.С. Успенской. В качестве гепариноида использовали древовидный пион Академик Садовничий, который создан в результате скрещивания двух дикорастущих видов: *P. suffruticosa* Andrews с *P. lutea* Franch. Сырье заготавливали в осенний период (с конца августа до середины октября) и хранили при температуре +3...+5°C. Для экспериментов готовили исходный 5%-ный экстракт из сухих чистых корней, которые растирали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния, далее производили выделение и очистку гепариноидов, для чего осаждали примеси белков путем добавления спиртового раствора с последующим центрифугированием и упариванием супернатанта, в котором и определяли наличие гепарина с использованием химического и фотоэлектроколориметрического методов (Шестаков, 1975; Шубина, Оберган, 2021). Обнаружено, что в 1 мг сухого порошка гепариноида содержится 35 мкг (30 МЕ) гепарина, для сравнения: в 1 мг коммерческого ВМГ (Spofa, Cesko) содержится 100 МЕ гепарина. Сравнение препаратов всех гепаринов проводили при одинаковых концентрациях гепаринов в исследуемых веществах. В качестве стандартных препаратов сравнения использовали гепарины животного происхождения —

НМГ (Celsus, USA) и ВМГ (Spofa, Česko). Создавали комплексные соединения гепариновых препаратов с ГК следующим образом: каждый из гепаринов и ГК растворяли в воде (рН 7.0–7.2) и соединяли их таким образом, чтобы в получаемых растворах весовое соотношение гепарина и ГК составляло 1 : 4. Эти смеси инкубировали при 37°C в течение 15–20 мин. Далее все комплексные соединения гепарина разбавляли в 100 раз, вследствие чего в 1 мл исходных растворов комплексов содержалось 10 мкг гепаринов и 40 мкг ГК. Делали от 5 до 10 повторов по каждому разведенному образцу. Все расчеты проводили на основе используемого гепарина.

Для проведения исследований кровь брали из яремной вены (*vena jugularis*) с анестезией телазолом (общепринятый метод для взятия крови у крыс) с использованием в качестве консерванта 3.8%-ного цитрата натрия в соотношении 9 : 1. Для получения бедной тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали при 3000 g в течение 10–12 мин.

Для выявления механизма антикоагулянтного действия полученных соединений, содержащих гепарин или гепариноид, совместно с ГК использовали разные тесты по изучению временных интервалов свертывания крови, а именно: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), характеризующее внутренний путь свертывания крови, тромбиновое время (ТВ), свидетельствующее об общем пути свертывания крови, и протромбиновое время (ПВ), оценивающее внешний путь свертывания крови. Для характеристики параметров фибринолитического звена противосвертывающей системы крови готовили пластины нестабилизированного фактором XIIIa фибрина с наличием непрочных водородных связей в растворимом фибрин-полимере. В плазме крови определяли следующие биохимические параметры гемостаза: на нестабилизированных фибриновых пластинах – суммарную фибринолитическую активность (СФА), включающую активность комплексов гепарина с компонентами плазмы крови и активность пламина; фибриндеполимеризационную активность (ФДПА), отражающую процессы деполимеризации фибрина. Кроме того, проводили измерение концентрации фибриногена.

Все указанные методы исследования подробно описаны в монографиях (Баркаган, Момот, 2008; Ляпина и др., 2012; Шубина, Оберган, 2021).

Статистический анализ данных осуществляли, используя пакет статистических программ Statistica 8 (StatSoft Inc., USA). Эмпирические распределения проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для полярного сравнения независимых групп применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Полученные данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные для анализа соединения каждого из гепариновых препаратов (коммерческие ВМГ и НМГ, гепариноид) с ГК включали 10 мкг гепаринов. При сравнении антикоагулянтного действия соединений каждого из гепаринов с ГК выявлен достоверный антикоагулянтный эффект, по сравнению с контролем (0.85% NaCl), по тесту АЧТВ у соединений с гепариноидом (увеличение на 27%), с ВМГ (увеличение на 20%) и с НМГ (повышение на 15%). В то же время наблюдалось достоверное удлинение ТВ на 21% под влиянием соединения с ВМГ, и отмечалась лишь тенденция к увеличению ТВ на 8% при действии комплекса с гепариноидом, по сравнению с контролем. При анализе влияния соединений на внешний путь свертывания крови по результатам определения ПВ установлено, что только соединение ГК с гепариноидом достоверно удлиняло ПВ. Комплекс коммерческого НМГ с ГК не оказывал эффекта на изменение ТВ и ПВ, по сравнению с контрольными пробами. Из составных частей соединений лишь ВМГ в дозе, эквивалентной его содержанию в комплексе, удлинял ТВ на 13%, а также гепариноид повышал ПВ на 13%, по сравнению с контролем (табл. 1).

Итак, при использовании различных тестов определения изменения антикоагулянтной активности крови (на внутренний, внешний и общий пути свертывания крови) под воздействием исследуемых нами препаратов следует отметить, что механизмы антикоагулянтного действия соединений ВМГ с ГК обусловлены их влиянием и на внутренний, и на общий пути свертывания крови; механизм антикоагулянтного действия гепариноидного комплекса с ГК реализуется через внешний и внутренний пути свертывания, так как мы наблюдали удлинение временных параметров по тестам АЧТВ и ПВ; комплекс коммерческого НМГ с аминокислотой также влиял на внутренний и внешний пути свертывания крови, но в меньшей степени, чем гепариноидное соединение, причем гепариноидное соединение обладало слабым антитромбиновым эффектом, влияя на общий путь свертывания крови. Следовательно, наибольший антикоагулянтный эффект обнаружен в основном у комплекса гепариноида с ГК.

Таким образом, при взаимодействии гепаринов с аминокислотой возникает новое соединение с новыми свойствами. При сравнении эффектов всех трех комплексных соединений отмечено, что комплексы ВМГ с аминокислотой из-за значительной антитромбиновой активности (удлинение ТВ) при передозировке могут оказать негативное влияние на гемостатическую систему организма и вызвать или кровоточивость, или рикошетный эффект. В то же время комплекс гепариноида с ГК, обладая значительной антикоагулянтной активностью по тесту АЧТВ, умеренной по тесту ПВ и слабой по тесту ТВ, при передозировке исключает проявление отрицательного эффекта в виде геморагий. Соединение же коммерческого НМГ с ГК,

**Таблица 1.** Антикоагулянтная активность по тестам АЧТВ, ТВ, ПВ комплексных соединений разных видов гепаринов (ВМГ, НМГ, гепариноид) с ГК и их составных частей в эквивалентном количестве в условиях *in vitro* ( $M \pm m$ )

Исследуемые вещества	Антикоагулянтная активность по тестам		
	АЧТВ, с (%)	ТВ, с (%)	ПВ, с (%)
Контроль (0.85%-ный NaCl), $n = 10$	34.5 ± 1.5 (100%)	21.4 ± 0.5 (100%)	19.4 ± 1.5 (100%)
Комплекс ВМГ с ГК, $n = 9$	41.4 ± 1.3* (120%)	26.0 ± 1.5* (121%)	21.6 ± 1.3 (111%)
Комплекс НМГ с ГК, $n = 8$	39.8 ± 1.3* (115%)	21.5 ± 1.5 (100%)	21.7 ± 0.9 (111%)
Комплекс гепариноида с ГК, $n = 10$	44.0 ± 0.7* (127%)	23.1 ± 0.7 (108%)	25.1 ± 1.0* (127%)
ВМГ, $n = 7$	37.0 ± 0.9 (107%)	25.3 ± 1.7* (113%)	21.1 ± 1.3 (109%)
НМГ, $n = 7$	36.0 ± 1.1 (104.7%)	21.4 ± 1.0 (100%)	21.2 ± 1.3 (110%)
Гепариноид, $n = 8$	36.5 ± 1.3 (105%)	22.2 ± 1.1 (103.7%)	22.2 ± 1.2* (113%)
ГК, $n = 7$	34.7 ± 1.3 (101%)	21.33 ± 1.1 (100%)	19.3 ± 1.0 (100%)

Примечание: статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, приняты за 100%, \*  $p < 0.05$ . ВМГ и НМГ – коммерческие препараты.

проявляя слабую антикоагулянтную активность по тесту АЧТВ и ПВ, также не способен вызывать при передозировке кровоточивость. Таким образом, соединение гепариноида с ГК имеет преимущество перед другими исследованными нами комплексами с коммерческими препаратами, поскольку это соединение, хотя и незначительно, но ингибирует тромбин, видимо, за счет дополнительных компонентов, что требует дальнейшего изучения.

По влиянию комплексных соединений разных видов гепаринов на процессы полимеризации фибрина отмечено следующее: максимальные антиполимеризационные изменения фибрина имеются у соединения гепариноида с ГК. Показано, что СФА и ФДПА этого соединения, по сравнению с другими комплексами, включающими гепарины животного происхождения, максимальны и превышают контрольный уровень в 6.2 и в 6.4 раза соответственно, в то время как соединение коммерческого НМГ с ГК превышает по этим активностям контрольный уровень в меньшей степени – в 5.1 и 5.2 раза соответственно. Комплекс ВМГ с ГК, по сравнению с другими соединениями, в наименьшей степени ингибировал полимеризацию фибрина. Следует также отметить, что все исследуемые комплексные соединения не вызывают изменения концентрации фибриногена плазмы, что указывает на отсутствие их влияния на фибринолиз (табл. 2).

В отношении влияния комплексных препаратов на степень полимеризации фибрина необходимо подчеркнуть, что исходные препараты гепаринов ее не изменяли, в то время как исследуемые комплексные гепариновые соединения с ГК проявляли СФА в основном за счет усиления ФДПА, то

есть препятствовали полимеризации фибрина. Установлена максимальная ФДПА у соединений растительного гепариноида с ГК (табл. 2).

Анализируя полученные результаты, необходимо отметить, что гепариноид (из пиона Академик Садовничий), как и коммерческий НМГ, демонстрирует не только антикоагулянтный эффект, но и способность препятствовать полимеризации фибрина, усиливая свое фибриндеполимеризационное действие. По данным литературы, при действии других растительных антикоагулянтов (Кричевский, 2015; Pawlaczyk et al., 2011) также выявлено их фибринолитическое действие. Ранее (Бышевский и др., 2012) сообщалось об ограничении взаимодействия тромбина с фибриногеном с последующим предотвращением процессов полимеризации фибрина под влиянием ингибиторов растительного происхождения, что мы и наблюдали в наших исследованиях. Возможным механизмом активирующего действия гепариноида из пиона на антикоагулянтные свойства плазмы и суммарную фибринолитическую активность является блокада активности фермента тромбина и факторов как внутреннего, так и внешнего (в том числе тканевого фактора) механизмов свертывания крови. Установлено, что соединение гепариноида с ГК снижает степень полимеризации фибрина, в связи с чем этот гепариноид представляет фармакологический интерес в плане его применения для профилактики заболеваний, осложняющихся тромбозами.

Многие растения обладают способностью модифицировать гемостаз. Антикоагулянтная активность извлечений из растений обусловлена содержанием в них гликопептидов, механизм действия

**Таблица 2.** СФА, ФДПА и концентрация фибриногена в плазме крыс после воздействия комплексных соединений разных видов гепаринов (ВМГ, НМГ, гепариноида) с ГК и их составных частей в эквивалентном количестве в условиях *in vitro* ( $M \pm m$ )

Исследуемые вещества	Показатели гемостаза		
	СФА, мм <sup>2</sup>	ФДПА, мм <sup>2</sup>	концентрация фибриногена (мг%) (%)
Контроль (0.85%-ный NaCl), $n = 8$	4.0 ± 0.5	3.8 ± 1.0	310 ± 10.5 (100%)
Комплекс ВМГ с ГК, $n = 7$	16.2 ± 1.2*	15.5 ± 1.3*	310 ± 8.5 (100%)
Комплекс НМГ с ГК, $n = 7$	20.8 ± 1.1*	20.5 ± 1.5*	308 ± 12.1 (99.3%)
Комплекс гепариноида с ГК, $n = 8$	25.0 ± 0.7*	25.1 ± 0.7*	301 ± 5.5 (97%)
ВМГ, $n = 5$	5.0 ± 0.9	4.0 ± 1.3	308 ± 12.1 (99%)
НМГ, $n = 5$	3.5 ± 1.1	3.0 ± 0.7	308 ± 2.1 (99%)
Гепариноид, $n = 5$	5.5 ± 1.3	5.0 ± 1.1	307 ± 1.4 (99%)
ГК, $n = 5$	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.1	309 ± 7.4 (100%)

Примечание: статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятых за 100%, \* $p < 0.05$ .

которых имеет сходство с N-концевыми аналогами участка  $\alpha$ -цепи молекулы фибриногена, ограничивающими ферментативное превращение фибриногена в фибрин. Интересен тот факт, что прямые антикоагулянты растительного происхождения, отличаясь по механизму действия от использующихся в настоящее время антикоагулянтов животного происхождения, не обладают выраженным токсическим действием на организм лабораторного животного (Криштанов и др., 2005). Таким образом, можно заключить, что остается актуальным поиск и изучение новых средств направленного воздействия на гемостаз, оказывающих быстрый и достаточно продолжительный эффект. Значительное место в этих исследованиях занимают растения.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые установлена способность гепариноида из корней пиона Академик Садовничий совместно с глутаминовой кислотой проявлять синергические антикоагулянтные и фибриндеполимеризационные эффекты, превышающие таковые одного гепариноида в тех же концентрациях.

Исследованный нами гепариноид из пиона Академик Садовничий совместно с глутаминовой кислотой обладает как ингибирующим эффектом на внутренний и внешний механизмы свертывания, так и антитромботической активностью, ингибируя не только фактор Ха, но и частично тромбин.

Установлена закономерность проявления антикоагулянтного действия средств на основе разных гепаринов при включении в систему глута-

миновой кислоты и показано, что комплексные средства глутаминовой кислоты с высокомолекулярным гепарином животного происхождения обладают антитромбиновым действием, с растительным гепарином – проявляют высокую антикоагулянтную активность по тестам АЧТВ и ПВ и слабое антитромбиновое действие. Наилучшим по эффективности и безопасности противосвертывающим средством является комплекс растительного гепарин(оид)а.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед, 2008. 282 с.
- Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В. и др. Методы определения активности гепарина. Учебно-методическое пособие. М.: ДПО РМАПО, 2015. 64 с.
- Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Калинин Е.П. и др. Ингибиторы самосборки фибрина растительного происхождения // Мед. наука образов. Урала. 2012. Т. 13 (1). С. 163–170.

- Кричевский Л.А. Низкомолекулярные гепарины в современной системе управления свертываемостью крови // *Anesthesiol. Crit. Care Med.* 2015. Т. 117 (16). С. 42–48.
- Криштанов Н.А., Сафонова М.Ю., Болотова В.Ц. и др. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств // *Вестник ВГУ. Сер. Биол. Хим. Фарм.* 2005. № 1. С. 212–221.
- Кузнецова С.А., Дрозд Н.Н., Кузнецов Б.Н. и др. Антикоагулянтное средство. Патент № 2399377. Рег. 13.03.2009. Публ. 20.09.2010.
- Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс-издательство, 2010. 832 с.
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М.: Адвансед Солюшнз, 2012. 160 с.
- Ляпина М.Г., Успенская М.С., Майстренко Е.С. О механизме антикоагулянтного действия экстракта из корней пиона молочноцветкового // *Межд. журн. прикл. фонд. иссл.* 2016. № 11. С. 1091–1093.
- Николаева Л.С., Ляпина Л.А. Метод создания новых высокоактивных антикоагулянтов крови на основе термодинамических моделей химических равновесий и коагуляционного анализа *in vivo* и *in vitro*. М.: Ким Л.А., 2019. 132 с.
- Стручкова И.В., Брилкина А.А. Аминокислоты. Учебно-методическое пособие. Н. Новгород: ННГУ, 2016. 32 с.
- Шестаков В.А. Принципы коррекции гипергепаринематических кровотечений // *Грудная хирургия.* 1975. № 2. С. 41–44.
- Шубина Т.А., Оберган Т.Ю. Функциональное состояние противосвертывающей системы крови. Практические вопросы. М.: Ким Л.А., 2021. 134 с.
- Beurskens D.M.H., Huckriede J.P., Schrijver R. et al. The anticoagulant and nonanticoagulant properties of heparin // *Thromb. Haemost.* 2020. V. 120 (10). P. 1371–1383.  
<https://doi.org/10.1055/s-0040-1715460>
- Li H., Mao W., Hou Y. et al. Preparation, structure and anticoagulant activity of a low molecular weight fraction produced by mild acid hydrolysis of sulfated rhamnan from *Monostroma latissimum* // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 114. P. 414–418.
- Marbet G.A. Heparins // *Ther. Umsch.* 2003. V. 60 (1). P. 10–13.  
<https://doi.org/10.1024/0040-5930.60.1.10>
- Onishi A., Ange K.St., Dordick J.S., Linhardt R.J. Heparin and anticoagulation // *Front. Biosci.* 2016. V. 21 (7). P. 1372–1392.  
<https://doi.org/10.2741/4462>
- Pawlaczyk I., Czerchawski L., Kuliczkowski W. et al. Anticoagulant and antiplatelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L. // *Thromb. Res.* 2011. V. 127 (4). P. 328–340.
- Wu M., Xu L., Zhao L. et al. Structural analysis and anticoagulant activities of the novel sulfated fucan possessing a regular well-defined repeating unit from sea cucumber // *Mar. Drugs.* 2015. V. 13 (4). P. 2063–2084.  
<https://doi.org/10.3390/md13042063>
- Xiao C., Lian W., Zhou L. et al. Interactions between depolymerized fucosylated glycosaminoglycan and coagulation proteases or inhibitors // *Thromb. Res.* 2016. V. 146. P. 59–68.  
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.08.027>
- Zhang S.B. *In vitro* antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates // *Food Chem.* 2016. V. 202. P. 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.108>

## Comparative Studies of Complex Products Based on Heparins of Animal and Plant Origin

M. S. Uspenskaya<sup>a</sup>, L. A. Lyapina<sup>a, \*</sup>, S. M. Sorokoletov<sup>b</sup>, M. G. Lyapina<sup>a</sup>, and M. D. Kalugina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

<sup>b</sup>Botkin City Clinical Hospital, Moscow, Russia

\*e-mail: lyapinal@mail.ru

Complex preparations based on heparins of animal and vegetable origin with the inclusion of glutamic acid in a weight ratio of 1 : 4 were obtained. High molecular weight (HMH) and low molecular weight (LMWH) commercial preparations of heparins were used as heparins of animal origin, heparinoid was used as heparin of plant origin, isolated from the roots of the peony Akademik Sadovnichy (heparinoid). Their influence on the state of plasma hemostasis under *in vitro* conditions was studied in a comparative aspect. It has been established that all complex compounds have anticoagulant activity, which, according to the results of our studies, is realized by a different mechanism of their action on blood coagulation – on the internal, external, or general pathways of blood coagulation. HMH complexes with glutamic acid had an antithrombin effect, affecting the internal and general coagulation pathways, while LMWH complexes with glutamic acid, exerting anti-Xa activity, affected the internal pathway of coagulation activation, and the combination of heparinoid with glutamic acid inhibited factors not only internal, but also external ways of blood coagulation. In addition, the latter compound exhibited weak antithrombin activity. It was also shown that all heparin complexes prevented fibrin polymerization, increasing the fibrin depolymerization activity of plasma, and in the heparinoid compound, this activity was higher by 10–17% compared to other commercial agents. Thus, the best anticoagulant in terms of efficacy and safety is the heparinoid complex with glutamic acid.

**Keywords:** high and low molecular weight heparins, peony root heparinoid, heparin-glutamic acid complexes, anticoagulant activity, fibrin polymerization

УДК 612.115:578.834.1

## АКТИВАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ И МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ТРОМБОЭМБОЛИЙ У БОЛЬНЫХ С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ COVID-19. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

© 2023 г. **Б. И. Кузник**<sup>1</sup>, Ю. Н. Смоляков<sup>1</sup>, \*, Н. Н. Цыбиков<sup>1</sup>, К. Г. Шаповалов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Читинская государственная медицинская академия, Чита, Россия

\*e-mail: smolyakov@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.03.2023 г.

После доработки 04.05.2023 г.

Принята к публикации 05.05.2023 г.

В обзоре освещается механизм развития гиперкоагуляции и тромбообразования при тяжелых формах течения COVID-19. Внедрение в организм хозяина SARS-CoV-2 осуществляется при взаимодействии шиповидного белка S с ангиотензинпревращающим ферментом ACE2, находящимся в альвеолах 2-го типа, эндотелии сосудов, почках, печени и других органах. В случае развития тяжелого состояния у больных COVID-19 активируется как неспецифический, так и адаптивный иммунитет. Стимуляция системы комплемента с появлением фрагментов C3a, C3b, C5a и мембраноатакующего комплекса создает условия для развития гиперкоагуляции. Вовлечение в этот процесс ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и появление ангиотензина 2 (Ang II) еще сильнее увеличивает интенсивность гиперкоагуляции. При внедрении SARS-CoV-2 в клетки защитная реакция адаптивной иммунной системы может превращаться в патологическую – развивается цитокиновый шторм, характеризующийся высоким уровнем провоспалительных цитокинов (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-17 и др.) и хемокинов (CCL2, CCL11 и др.), что в конечном итоге ведет у тяжелобольных COVID-19 к развитию тромбоангиопатии или, иначе, иммунотромбозу. У пациентов с более тяжелым поражением может развиваться состояние, подобное синдрому диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС). При этом у пациентов с COVID-19 выявляется легкая тромбоцитопения, повышенный уровень фибриногена, D-димера, продуктов деградации фибриногена, что свидетельствует об интенсивном тромбообразовании, а также сокращенные показатели протромбинового времени (ПВ) и активированного частичного тромбопластинного времени (АЧТВ), обусловленные в значительной степени увеличенным уровнем FVIII. При COVID-19, наряду с классическим, проявляется альтернативный путь (минуя тромбин) регуляции системы гемостаза и тромбообразования, связанный в основном с влиянием шиповидного белка S SARS-CoV-2 и папаиноподобной протеазы. Шиповидный белок S непосредственно влияет на переход фибриногена в фибрин и протромбина в тромбин, а также на активацию отдельных плазменных факторов свертывания крови. Альтернативный путь свертывания крови также обусловлен активацией системы комплемента по лектиновому пути с включением металлопротеиназ MASP-1, -2, -3. Кроме того, шиповидный белок S активирует tPA, что может сопровождаться гиперфибринолизом. У тяжелобольных COVID-19 далеко не последняя роль в возникновении тромбоэмболических осложнений принадлежит тромбоцитам. В процессе реакции высвобождения тромбоциты выбрасывают из цитоплазмы в кровь  $\alpha$ - и плотные гранулы, содержащие воспалительные цитокины и хемокины, что усиливает цитокиновый шторм и, следовательно, тромбообразование. Воздействуя на шиповидный белок S, тромбоциты запускают альтернативный механизм системы гемостаза и тромбообразования.

**Ключевые слова:** COVID-19, тромбоциты, шиповидный белок S, система комплемента, цитокиновый шторм, нейтрофилы, моноциты, гиперкоагуляция, тромбообразование, альтернативные механизмы

**DOI:** 10.31857/S0042132423040075, **EDN:** ZBIHAN

### ВВЕДЕНИЕ

Вспыхнув в конце 2019 г. в г. Ухань (Китай), инфекция, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2, получившая название COronaVIrus Disease 2019 (COVID-19), вскоре охватила все континенты.

Уже в марте 2020 г. ВОЗ объявила COVID-19 пандемией. За время своего господства COVID-19 унесла во всем мире миллионы жизней. На конец 2022 г. число летальных исходов при COVID-19 во всем мире составило более 6.5 млн человек (Liang et al., 2023). Особенность SARS-CoV-2, вызвавшие-

го пандемию COVID-19, – постоянное развитие и быстрое распространение среди бессимптомных носителей с производством новых вариантов: альфа, бета, гамма, дельта, лямбда, эпсилон, зета, эта, тета, йота, каппа и омикрон, что лишний раз указывает на высокую глобальную угрозу для здоровья населения всего мира (Liang et al., 2023). Тщательный анализ (Chen, 2022) показал, что к 2023 г. COVID-19 может оказаться более смертоносным, чем сезонный грипп. Столь неутешительный прогноз связан с тем, что снизилась эффективность моновалентных вакцин в период преобладания варианта Omicron BA.4/BA.5 (Canada, 2023), а также с появлением нового подварианта Omicron XBB.1.5 (кракен), представляющего собой сублинию варианта XBB, рекомбинанта двух сублиний BA.2 с мутацией F486P в шиповидном белке, которая увеличивает инфекционность из-за повышенной аффинности связывания с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2). На 21.01.2023 г. подвариант XBB.1.5 зарегистрирован в 49.1% случаев COVID-19 в США (Parums, 2023).

Не вызывает сомнений, что основной причиной смерти при COVID-19 является острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), часто сопровождаемый тромбоэмболическими осложнениями (Grobler et al., 2020). Тяжелое течение COVID-19 сопровождается наличием различных коагулопатий, которые могут привести либо к выраженной тромбоцитопении и геморрагиям, либо к гиперкоагуляции и тромбозу. Тромбозы, тромбоэмболии и геморрагии часто возникают у лиц со слабой конституцией, множественными факторами риска и сопутствующими заболеваниями (Grobler et al., 2020).

Тромбозы являются подлинным бичом COVID-19. Тромботические осложнения, выраженные в виде сепсис-индуцированной коагулопатии, ДВС-синдрома, венозной и артериальной тромбоэмболии (ВТЭ и АТЭ), легочной эмболии, микротромбоза и тромботической микроангиопатии, поражают различные органы: легкие, сердце, почки и головной мозг (Sastry et al., 2022).

При анализе результатов 4547 исследований, насчитывающих 100949 пациентов, сделан вывод (Candeloro, Schulman, 2023), что 2641 (2.6%) из них перенесли АТЭ. Суммарная частота АТЭ составляет 2.0% (95%, ДИ 0.4–9.6%), а для острого инфаркта миокарда, острого ишемического инсульта, острой ишемии конечностей и других тромбоэмболических осложнений – 0.8% (95%, ДИ 0.1–8.1%), 0.9% (95%, ДИ 0.3–2.9%), 0.2% (95%, ДИ 0.0–2.9%), 0.5% (95%, ДИ 0.1–3.0%) соответственно.

Согласно данным (Nahum et al., 2020), распространенность тромбоза глубоких вен среди пациентов с COVID-19, находящихся в критическом

состоянии и не получавших антикоагулянтную терапию, составляет 65–79%. При патологоанатомическом вскрытии больных тромбоцитарно-фибриновые сгустки в мелких артериальных сосудах наблюдаются в 87% случаев.

Отмечено (Lippi, Favaloro, 2023), что клиническое течение COVID-19 часто осложняется возникновением венозного тромбоза, ВТЭ, тромбозов легочных артерий. При этом кумулятивная частота ВТЭ у госпитализированных пациентов с COVID-19 может достигать 30% и у больных с тяжелым течением, искусственной вентиляцией легких и поступивших в отделение реанимации и интенсивной терапии может увеличиться до 40–70%. Но даже несмотря на стандартную тромбопрофилактику, у больных COVID-19 частота тромбоэмболических осложнений колеблется от 27 до 57% (Thomas et al., 2020).

Тщательно проведенный метаанализ 27 исследований, в которых приняли участие 3342 пациента с COVID-19, показывает, что тромбоэмболия легочной артерии в общей когорте больных встречается в 16.5%, тромбоз глубоких вен – в 14.8%. При этом тромбоэмболия легочной артерии чаще диагностируется у пациентов, поступивших в отделение реанимации и интенсивной терапии, по сравнению с теми, кто лечится в общем стационаре (24.7% против 10.5%) (Suh et al., 2021).

Вместе с тем, при изучении коагулопатий у тяжелобольных COVID-19 установлено, что наряду с классическим механизмом развития тромбоэмболических осложнений, существуют и иные пути, которые следует назвать альтернативными – образование фибриновых сгустков происходит, минуя появление тромбина. Подобные реакции осуществляются под влиянием: шиповидного белка S и папаиноподобной протеазы SARS-CoV-2; действия фрагментов комплемента и мембраноатакующего комплекса; активации ренин-ангиотензин-альдостероновой и калликреин-кининовой систем; гиперстимуляции иммунного ответа, приводящего к цитокиновому шторму; металлопротеиназ (MASP-1, -2, -3); активированных нейтрофилов с образованием нейтрофильных внеклеточных ловушек NETs (neutrophil extracellular traps); микровезикул различного происхождения; действия повышенной концентрации триптаза, главным образом трипсина; других пока еще мало изученных факторов (Zhang Y. et al., 2020; Grobbelaar et al., 2021). Следует заметить, что альтернативные методы свертывания крови и тромбообразования всегда протекают одновременно с внешним – через тканевый фактор TF (tissue factor) – и внутренним – через фактор FXIIa – механизмами активации системы гемостаза. Более того, оба пути – и классический, и альтернативный – тесно связаны между собой и оказывают влияние друг на друга (Кузник и др., 2023).

Вместе с тем, мы не встретили обзорных работ, в которых бы освещалась роль тромбоцитов в возникновении альтернативных путей процесса свертывания крови и фибринолиза, что и побудило нас заняться поиском и обобщением имеющейся литературы.

### СТРОЕНИЕ SARS-CoV-2 И ПУТИ ЕГО ПРОНИКНОВЕНИЯ В КЛЕТКУ

Известно, что вирион SARS-CoV-2 состоит из протеинонуклеокапсида (N), мембраны, оболочки и шиповидного белка S. Этапы проникновения вирусных частиц, включая прикрепление к мембране клетки-хозяина и слияние, опосредуются наличием шиповидного гликопротеина S. Последний собирается в виде гомотримера и встраивается в виде нескольких копий в мембрану вириона, придавая ему вид, напоминающий корону. Входные гликопротеины SARS-CoV-2 в инфицированных клетках расщепляются протеиназами (в частности фурином) на две субъединицы: внеклеточную S1 и трансмембранную S2 (Hoffmann et al., 2020; Xiao et al., 2021). При этом субъединица S1 способна связываться с ACE2, а субъединица S2 закрепляет белок S на мембране. Субъединица S2 также включает пептид слияния и другие механизмы, необходимые для обеспечения взаимосвязи мембран при инфицировании клетки. Расщепление сайта S2 трансмембранной протеазой серином 2 (TMPRSS2) на клеточной поверхности или катепсином в эндосомальном компартменте после ACE2-опосредованного эндоцитоза высвобождает пептид слияния, инициируя образование пор, приводящих к гибели клетки (Hoffmann et al., 2020; Jackson et al., 2022).

Следует подчеркнуть, что рецептор-связывающий домен RBD (receptor binding domain) тримера S образует вершину белка S, который имеет две различные конформации: “вверх” — для доступного для рецептора состояния и “вниз” — для недоступного для него положения. В состоянии после слияния конформационные изменения приводят к отделению субъединицы S1 от S2 и ее диссоциации от S2. В это время S2 подвергается каскаду событий рефолдинга с образованием стабильного и удлиненного тримера. Переход RBD из конформации “вниз” в конформацию “вверх” — критический шаг перед тем, как рецептор сможет полностью быть задействован в связи SARS-CoV-2 с ACE2. Конформация RBD “вверх”, по-видимому, является стабильным промежуточным состоянием.

Структуры растворимого S-тримера SARS-CoV-2 в комплексе с мономерным ACE2 указывают на то, что рецептор взаимодействует с RBD в его повышенной конформации (Zhou et al., 2020; Xiao et al., 2021). В то время как аминокотерминал домена немного смещается наружу, субъединица S2 оста-

ется в значительной степени неизменной после связывания ACE2 (Zhou et al., 2020).

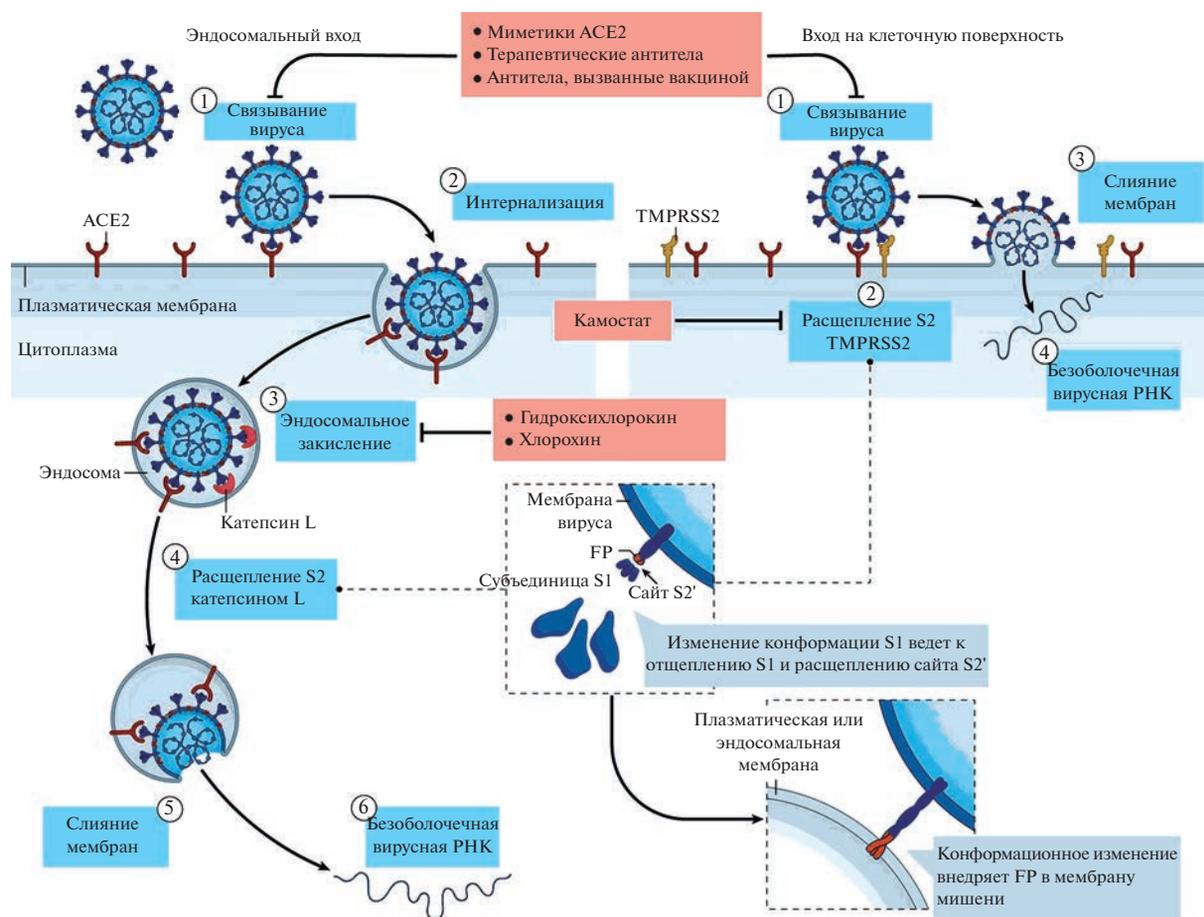
При этом белок S переходит в так называемое метастабильное состояние, склонное к трансформации, в положении с более низкой энергией, чем до слияния мембран. При этом (рис. 1) проникновение SARS-CoV-2 в клетку зависит от протеаз клетки-мишени; TMPRSS2 и катепсин L — две основные протеазы, участвующие в активации S-белка. Поскольку TMPRSS2 присутствует на клеточной поверхности, TMPRSS2-опосредованная активация S-белка происходит на плазматической мембране, а катепсин-опосредованная активация осуществляется в эндолизосомах (Jackson et al., 2022).

### МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ГИПЕРКОАГУЛЯЦИИ И ИММУНОТРОМБОЗА ПРИ COVID-19

Установлено, что рецепторы ACE2 в основном экспрессируются в сосудистом эндотелии, альвеолоцитах 2-го типа легких, холангиоцитах печени, ободочной кишки, кератиноцитах пищевода, эпителиальных клетках подвздошной и прямой кишки, эпителиальных клетках желудка и проксимальных канальцах почек (Qi et al., 2020).

Поступление SARS-CoV-2 в альвеолоциты 2-го типа происходит через эндоцитоз, после чего вирус размножается в цитоплазме, что сопровождается появлением стресс-белка, вызывающего апоптоз этих клеток. В то же время РНК из SARS-CoV-2 действует как патоген-ассоциированный молекулярный паттерн и распознается toll-подобными рецепторами TLRs. Это в свою очередь приводит к выбросу хемокинов, вызывающих миграцию и активацию нейтрофилов и моноцитов, что сопровождается разрушением альвеолярно-капиллярных стенок. При этом развивающийся патологический процесс в легких может приводить к потере границы между альвеолярным пространством и окружающей стромой, благодаря чему жидкость просачивается и заполняет альвеолы. Все это в конечном итоге приводит к развитию гиперкоагуляции и образованию тромбов (Kakodkar et al., 2020).

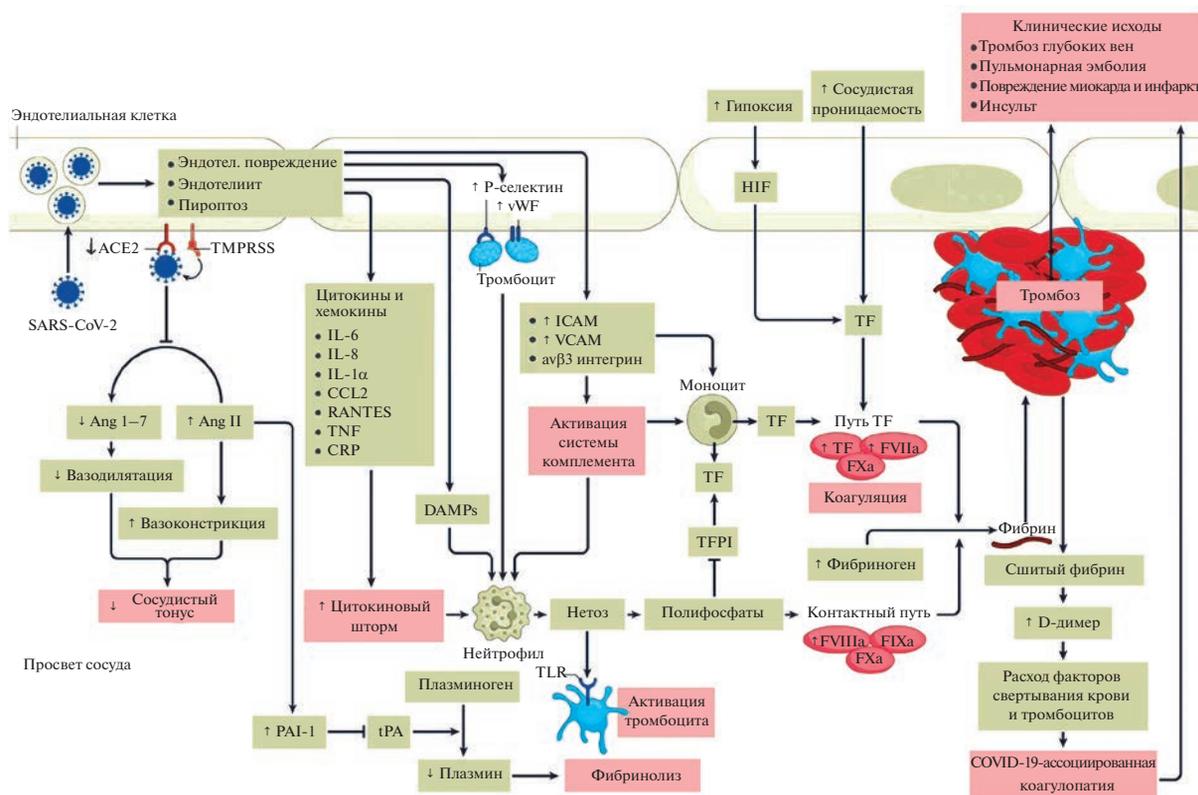
На основании изучения значительного числа источников литературы сделан вывод (Gorog et al., 2022), что патогенез коагулопатии при COVID-19 характеризуется значительной сложностью. После проникновения SARS-CoV-2 в эндотелиальную клетку (рис. 2) путем связывания с рецептором ACE2 его ферментативная активность снижается, что приводит к повышению проницаемости сосудов и экспрессии TF в субэндотелиальных клетках, в лейкоцитах и тромбоцитах. Все это запускает процесс коагуляции. ACE2 может оказывать антитромботическое действие с помощью различных механизмов, включая ренин-ангиотензи-



**Рис. 1.** Два пути проникновения SARS-CoV-2 в клетки (по: Jackson et al., 2022). Для процесса проникновения SARS-CoV-2 необходимы расщепления шиповидного белка S: 1) на стыке субъединиц S1 и S2; 2) на участке S2. Многоосновная последовательность SARS-CoV-2 на границе S1–S2 расщепляется во время созревания вируса в инфицированной клетке, но сайт S2' расщепляется в клетке-мишени после связывания ACE2. Связывание вируса с ACE2 (шаг 1) вызывает конформационные изменения в субъединице S1 и обнажает сайт расщепления S2' в субъединице S2. В зависимости от пути проникновения SARS-CoV-2 сайт S2' расщепляется разными протеазами. Слева: если клетка-мишень недостаточно экспрессирует TMPRSS2 или если комплекс вирус–ACE2 не сталкивается с TMPRSS2, комплекс вирус–ACE2 интернализуется благодаря клатрин-опосредованному эндоцитозу (шаг 2) в эндолизосомы, где расщепление S2' осуществляется катепсинами, которым для своей активности требуется кислая среда (шаги 3 и 4). Справа: в присутствии TMPRSS2 расщепление S2' происходит на поверхности клетки (шаг 2). В обоих путях проникновения расщепление сайта S2' обнажает слитый пептид FP, а отделение S1 от S2 вызывает резкие конформационные изменения в субъединице S2, особенно в гептадном повторе 1, продвигая FP вперед в мембрану-мишень, инициируя слияние мембран (шаг 5 слева и шаг 3 справа). Слияние между вирусной и клеточной мембранами образует пору слияния, через которую вирусная РНК высвобождается в цитоплазму клетки-хозяина для снятия оболочки и репликации (шаг 6 слева и шаг 4 справа).

новый путь, при котором Ang I преобразуется в Ang II, расщепляющий ACE2 до Ang (1–7). При этом снижение экспрессии ACE2 приводит к повышению уровня Ang II, который стимулирует экспрессию PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) в различных клетках, включая клетки гладкой мускулатуры, эндотелиоциты и адипоциты. Повышение уровня PAI-1 приводит к гипофибринолизу. Активация и дисфункция эндотелиальных клеток сопровождается воспалительным процессом, характеризующийся высоким уровнем провоспалительных цитокинов, высвобождением vWF (von Willebrand factor) и повышенной экспрессией молекул

адгезии, в том числе P-селектина на поверхности эндотелиальных клеток, что способствует образованию тромбов и рекрутированию лейкоцитов. Воспалительные цитокины и специфичные для вируса TLRs индуцируют экспрессию TF в моноцитах, что приводит к активации каскада коагуляции. Активация тромбоцитов с помощью передачи сигналов TLRs сопровождается повышенной реактивностью и агрегацией тромбоцитов. Стимуляция нейтрофилов приводит к появлению NETs, что ведет к активации коагуляции и обеспечивает основу для адгезии тромбоцитов, лейкоцитов и эритроцитов. Параллельно активации свер-



**Рис. 2.** Механизмы развития гиперкоагуляции и тромбоза при тяжелом течении COVID-19. Объяснение в тексте (по: Gorog et al., 2022).

тывания крови под воздействием TF происходит образование тромбина и фибрина, что позволяет тромбоцитам и другим клеткам крови создавать агрегаты и ведет к возникновению окклюзионного тромба (Gorog et al., 2022).

### РОЛЬ ТРОМБОЦИТОВ В РАЗВИТИИ ГИПЕРКОАГУЛЯЦИИ ПРИ COVID-19

Как было показано в предыдущем разделе, коагулопатия при COVID-19 связана с выраженной воспалительной реакцией, активацией и повреждением эндотелия (Хавинсон, Кузник, 2020; Ackermann et al., 2020; Connors, Levy, 2020; Tang et al., 2020; Wang, Doran, 2021). У пациентов с пневмонией, вызванной COVID-19, наблюдаются нарушения свертывания крови, чаще всего повышенный уровень фибриногена и D-димера, сочетающийся с легкой тромбоцитопенией (Ackermann et al., 2020; Connors, Levy, 2020; Levi et al., 2020). Повышенный уровень D-димера, как правило, связан с более высоким уровнем смертности. Одновременно у таких больных увеличивается содержание продуктов деградации фибриногена FDP (fibrinogen degradation products), что свидетельствует об интенсивном тромбообразовании. При этом уровень D-димеров и FDP с усилением тяжести

COVID-19 постепенно возрастает, и уровень фибриногена остается повышенным (Han et al., 2020). У части пациентов с COVID-19 выявляются аномально короткие ПВ и АЧТВ, что связано с увеличенным уровнем FVIII (Panigada et al., 2020). У пациентов с более тяжелым поражением может развиваться состояние, подобное ДВС-синдрому, с относительно небольшим удлинением ПВ и АЧТВ, при этом уровень фибриногена может оставаться в норме или быть повышенным (Connors, Levy, 2020).

Следует отметить, что увеличение в крови концентрации D-димера >2.5 мкг/мл при первоначальном обращении является прогностическим признаком тромбоза, критического состояния и смерти. Дополнительный маркер, позволяющий прогнозировать тромбоз во время госпитализации, при первичном обращении – количество тромбоцитов >450 × 10<sup>9</sup>/л или <100 × 10<sup>9</sup>/л. У пациентов с более выраженной тромбоцитопенией (<50 × 10<sup>9</sup>/л) отмечаются повышенные геморрагические проявления (Al-Samkari et al., 2020).

Согласно данным (Escher et al., 2020), у госпитализированных пациентов с COVID-19 повышены циркулирующие маркеры активации эндотелиальных клеток, включая vWF, PAI-1, молекулы межклеточной адгезии 1 ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), молекулы адгезии сосудистых

клеток 1 VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) и P-селектин. Кроме того, у таких больных значительно повышено содержание фибриногена, tPA и его ингибитора PAI-1, а также ST2 — рецептор IL-33. Более высокий уровень tPA, ST2 и vWF во время госпитализации связан с более низкими показателями выживаемости, а тромботические события более часты у пациентов с исходно более высокой концентрацией vWF (Escher et al., 2020).

Повреждение эндотелия, опосредованное SARS-CoV-2, способствует активации тромбоцитов, повышению уровня CD40L и P-селектина в плазме, обеспечивая таким образом положительную обратную связь для образования тромботической пробки и опосредованного образования тромбина. В умеренной стадии заболевания наблюдается активация тромбоцитов, увеличение уровня фибриногена и PAI-1, развитие гиперкоагуляции. Уровень tPA не изменяется у пациентов со средней тяжестью, но значительно повышается в тяжелых случаях COVID-19 (Al-Tamimi et al., 2022).

Важный этап активации тромбоцитов — потеря асимметрии липидов, способствующая переходу анионных липидов, в частности фосфатидилсерина, на внешнюю мембрану. Эта перегруппировка мембранных фосфолипидов создает прокоагулянтную поверхность на тромбоцитах, где факторы свертывания крови могут закрепляться и активироваться. В то же время появившийся тромбин переводит фибриноген в фибрин, который взаимодействует с активированными тромбоцитами, что приводит к стабилизации агрегатов. Примечательно, что в тромбоцитах пациентов с COVID-19 обнаружена повышенная активность FXII, которая сопровождается укорочением АЧТВ, измеренного в богатой тромбоцитами плазме. Другими словами, тромбоциты пациентов с COVID-19 демонстрируют прокоагулянтный фенотип (Taus et al., 2020).

Известно, что увеличение фосфорилирования cPLA20 (cytosolic phospholipase A20) способствует повышению ее активности, что усиливает продукцию тромбоксанов. Оказалось, что содержание в плазме тромбоксанов  $\text{TxA}_2$  и  $\text{TxB}_2$  выше у пациентов с тяжелой формой COVID-19 (Hottz et al., 2020).

Тромбоцитопения у больных COVID-19 выявляется в 5–41.7% случаев, варьируя в зависимости от тяжести заболевания, и обычно имеет легкую форму (как правило,  $100\text{--}150 \times 10^9/\text{л}$ ). Уменьшение числа тромбоцитов чаще встречается среди пациентов пожилого возраста. Одновременно у таких больных выявлены более низкое абсолютное число нейтрофилов и лимфоцитов, более высокий уровень С-реактивного белка и более выраженное снижение соотношения  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ , чем у пациентов без тромбоцитопении (Guan et al., 2020; Zhang Y. et al., 2020; Wool, Miller, 2021).

При метаанализе (Jiang et al., 2020) исследований 7613 пациентов установлено, что у тяжелобольных число тромбоцитов меньше, чем у пациентов с нетяжелым течением заболевания. Более того, чем ниже число тромбоцитов, тем тяжелее протекает заболевание и тем выше риск летального исхода (Liu et al., 2020; Allaoui et al., 2021).

Следует отметить, что временная тенденция к снижению количества тромбоцитов клинически свидетельствует об усугублении тромботического состояния во время госпитализации — тромбоцитопения, наряду с гиперактивацией тромбоцитов (тромбоцитопатия), способствует чрезмерному тромбообразованию и нарушению регуляции иммунного ответа (Thachil et al., 2020).

Следует учесть, что тромбоциты на разных фазах течения COVID-19 участвуют в нарушении легочной микроциркуляции и дыхательной функции легких. Активированные тромбоциты теряют способность защищать целостность стенок кровеносных сосудов, повышая проницаемость микроциркуляторного русла легких. Высокий уровень маркеров активации тромбоцитов наблюдается и в тяжелых, и в легких случаях течения COVID-19, а также в краткосрочной и долгосрочной перспективе. У пациентов с COVID-19 можно обнаружить высвобождение различных микровезикул клеточного происхождения. В дополнение к обеспечению фосфолипидной поверхности для синтеза комплекса внутренней теназы и протромбиназы, экспонированный фосфатидилсерин тромбоцитов также способствует пробуждению TF, который затем способствует коагулянтной активности за счет образования комплекса с FVIIa для активации FX (Xiang et al., 2022).

Между тем, число тромбоцитов у пациентов с COVID-19 может быть повышено, что следует объяснить тремя возможными механизмами. Первый заключается в том, что инфекция индуцирует цитокиновый шторм, включая тромбопоэтин, IL-3, IL-6, IL-9 и IL-11, стимулирующие мегакариопоэз. При втором — повреждение эндотелия приводит к высвобождению vWF. Третий — сопровождается высвобождением тромбопоэтина, стимулирующего активность мегакариоцитов (Yang et al., 2020; Ulanowska, Olas, 2021). Особо следует отметить, что мегакариоциты производят тромбоциты в альвеолярных капиллярах пациентов с COVID-19 (Fox et al., 2020).

Согласно данным (Morris et al., 2020), активированные эндотелиальные клетки способствуют развитию коагулопатии посредством нескольких механизмов, включая рекрутирование тромбоцитов, независимо секретирующих TF и vWF, снижение активности тромбомодулина и протеина С при одновременной стимуляции PAR-1 (protease-activated receptor 1). При этом активированные в легких тромбоциты, являясь важным источником

провоспалительных цитокинов и АФК, способны усугублять воспалительные реакции, опосредованные нейтрофилами.

Помимо заболеваний легких, клинические осложнения COVID-19 включают повреждение миокарда и сосудистые заболевания, связанные с ишемией. Тяжелые проявления и неблагоприятный прогноз у этих больных связаны с гиперкоагуляционным состоянием, предрасполагающим к тромботическим осложнениям и, в конечном итоге, к летальному исходу. В этих ситуациях тромбоциты играют ключевую роль, поскольку вирусы могут индуцировать их активацию через TLRs и ось ACE2–Ang II (Violi et al., 2021).

Тромбоциты в легочных сосудах также являются мишенями для активации оксидативного стресса высоким уровнем провоспалительных цитокинов и реактантов, секретируемых альвеолярными макрофагами и стимулированными эпителиальными клетками 2-го типа. Активированные тромбоциты также становятся важным источником провоспалительных цитокинов и АФК (Sonmez, Sonmez, 2017). Необходимо отметить, что активированные тромбоциты секретируют несколько хемокинов, в первую очередь RANTES (regulated upon activation, normal t-cell expressed and secreted), CCL4 и PF4 (platelet factor 4), усиливающих активацию нейтрофилов, их выживаемость, рекрутирование в эндотелии и последующее прикрепление к эндотелиальным клеткам. Наконец, активированные тромбоциты также играют решающую роль в опосредовании и обострении воспалительных реакций при остром повреждении легких путем прямого связывания с нейтрофилами, что приводит к образованию тромбоцитарно-нейтрофильных комплексов (Stark, 2019).

Образуя комплексы с нейтрофилами, тромбоциты увеличивают их рекрутирование, активацию и экстраверсию в воспаленную легочную ткань, тем самым способствуя развитию ОРДС. Более того, секвестрированные тромбоцитарно-нейтрофильные комплексы вызывают развитие прокоагулянтной и провоспалительной среды, что приводит к возникновению имунотромбоза (Morris et al., 2020).

Тромбоциты могут взаимодействовать с циркулирующими моноцитами. У пациентов с тяжелой пневмонией, вызванной COVID-19, в жидкости бронхоальвеолярного лаважа обнаружено большое число воспалительных моноцитов — основных источников провоспалительных цитокинов, приводящих к развитию цитокинового шторма (Liao et al., 2020; Merad, Martin, 2020).

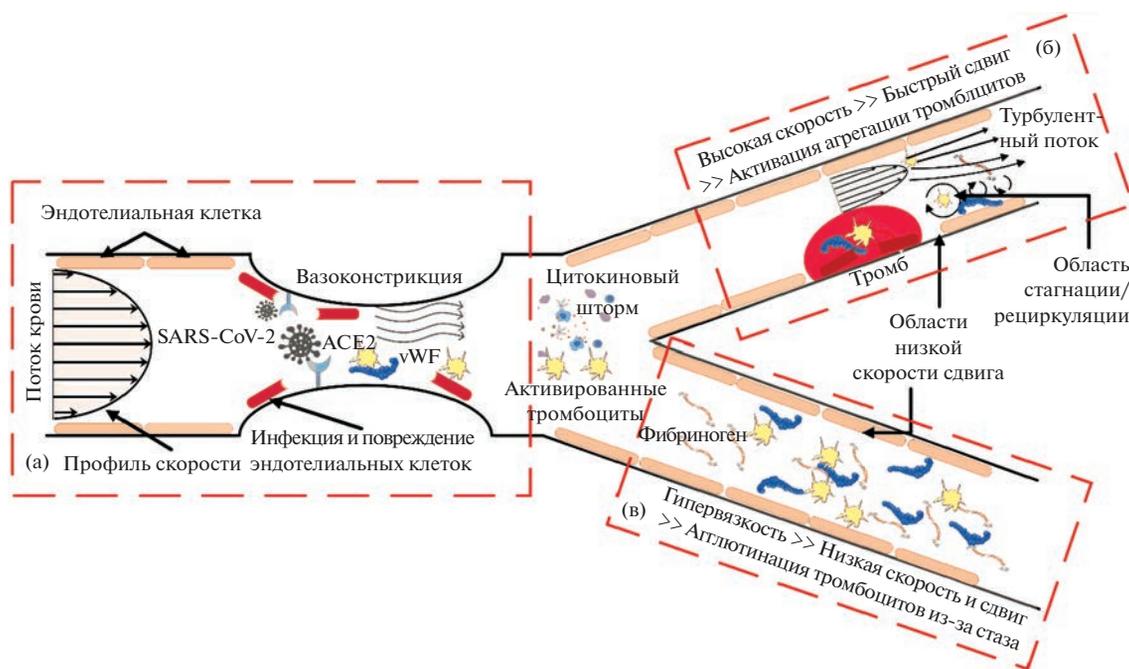
У тяжелобольных COVID-19 выявлена усиленная продукция крупных незрелых тромбоцитов, обладающих повышенной активностью. Кроме того, тромбоциты больных COVID-19 несут на своей мембране повышенное содержание vWF и P-селектина, что может быть еще одним механиз-

мом усиленного свертывания крови (Wool, Miller, 2021). При этом более крупные тромбоциты содержат большее количество плотных гранул и продуцируют больше активных соединений, включая TxA<sub>2</sub>, и, как полагают, обладают большей протромботической активностью (Ulanowska, Olas, 2021). К сказанному следует добавить, что для пациентов с тяжелой формой инфекции SARS-CoV-2 характерна не только гиперреактивность тромбоцитов, но и дефицит ADAMTS13, способного разбивать агрегаты, что усиливает процесс тромбообразования в мелких сосудах и гипоксию (D'Ardes et al., 2022).

Таким образом, можно считать, что коагулопатия COVID-19 представляет собой комбинацию локализованного потребления тромбоцитов в легких, ДВС-синдрома с развитием микроангиопатии. Повышенные уровни vWF и растворимого тромбомодулина указывают не только на активированный поврежденный эндотелий, но и на наличие стимулированных тромбоцитов. Отметим, что прогрессирующее увеличение vWF, истощение фибриногена с высокими уровнями D-димера и даже более высокая концентрация P-селектина с последующим цитокиновым штормом всегда свидетельствует о плохом прогнозе (Perico et al., 2022).

Обнаружена (Barrett et al., 2021) прямая связь между молекулой MRP8/14 (myeloid related protein 8/14), высвобождаемой тромбоцитами, и активацией эндотелиальных клеток. Увеличение числа эндотелиальных клеток в участках плотных межклеточных контактов, усиление коагуляции и провоспалительных процессов коррелирует с нарушением регуляции транскриптома тромбоцитов у больных COVID-19, экспрессией РНК и белкового продукта S100A8/A9. Эти транскриптомные изменения приводят к повышенной продукции IL-6 и IL-8 и корреляции тромбоцитарного и эндотелиального транскриптома с активацией тромбоцитов. Кроме того, у тяжелобольных COVID-19 циркулирующий уровень MRP8/14 связан с последующим тромбозом и смертью. Терапевтическое воздействие на P2Y12 тромбоцитов снижает мРНК тромбоцитов S100A8/A9 и провоспалительные взаимодействия тромбоцитов с эндотелием. Следовательно, тромбоциты усиливают дисфункцию эндотелиальных клеток и опосредуют тромбовоспаление. Также у пациентов с тяжелой формой COVID-19 более высокое содержание IL-6 и TNF-α в плазме может запускать активацию и коагуляционную активность тромбоцитов и в свою очередь усугублять тромбоз и гиперкоагуляцию (Kaur et al., 2022).

Важную роль в развитии гиперкоагуляции и тромбоза при COVID-19 играет нарушение гемодинамики. Повреждение эндотелия приводит к образованию зон рециркуляции/застоя, которые изменяют нормальную гемодинамику и связаны с



**Рис. 3.** Схема параметров гемодинамики в тромбированном кровеносном сосуде у пациентов с COVID-19 (по: Sastry et al., 2022). (а) SARS-CoV-2 связывается с рецепторами ACE2, вызывая повреждение эндотелиальных клеток, которое инициирует тромботические пути для образования тромба в различных условиях. Повреждение эндотелиальных клеток приводит к попаданию в кровоток TF, vWF, коллагена и других тромботических факторов, которые инициируют как внутренний, так и внешний пути коагуляционного каскада. Кроме того, просвет сосуда уменьшается из-за вызванной травмой вазоконстрикции. В мелких сосудах и капиллярах, в частности альвеолярных, вазоконстрикция должна оказывать значительное влияние, приводя к массивному капиллярному застою, диффузным микротромбам и повреждению органов. (б) В более мелких артериях происходит уменьшение просвета сосуда из-за образования тромба и сужения сосудов, что приводит к высоким линейным скоростям и быстрым сдвигам. Увеличение скорости сдвига вызывает морфологические изменения vWF, активируя тромбоциты и увеличивая образование тромбов. Позади тромба, вероятно, появляются зоны рециркуляции/застоя, и эти области связаны с массовым образованием агрегатов тромбоцитов. (в) У пациентов с COVID-19 наблюдается увеличение вязкости плазмы, что в более мелких венах и капиллярах приводит к низким линейным скоростям и медленным сдвигам. Нефизиологически низкие значения сдвига влияют на агглютинацию тромбоцитов.

отложением тромбоцитов. При этом отмечают значительные нарушения газообмена в легких. Это явление связано с перераспределением крови от мелких легочных сосудов либо из-за повышенного сосудистого сопротивления, либо из-за вазоконстрикции дистальных легочных артерий, либо из-за наличия микротромбов, адгезированных и агрегированных тромбоцитов, а, скорее всего, из-за комплекса перечисленных факторов (Thilai et al., 2021; Poor, 2021; Sastry et al., 2022) (рис. 3).

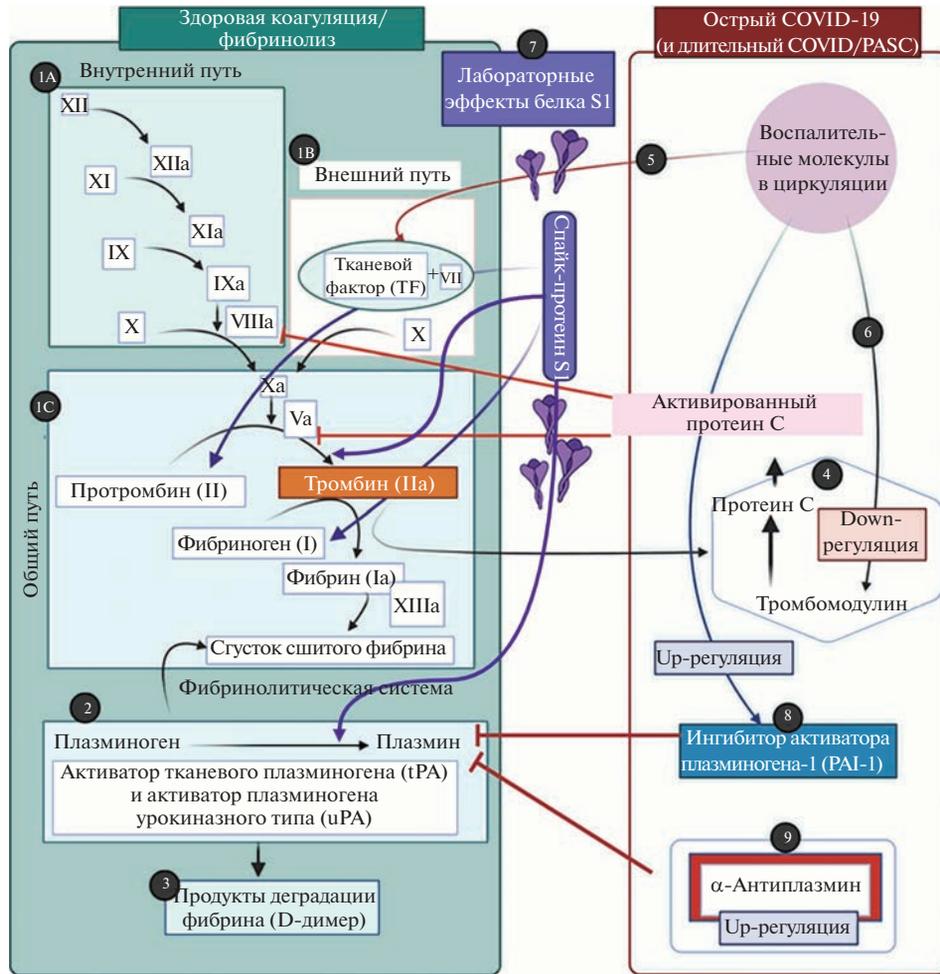
### РОЛЬ ТРОМБОЦИТОВ В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И ФОРМИРОВАНИЯ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ

Ранее мы указывали, что у тяжелобольных COVID-19 могут проявляться альтернативные пути образования (минуя тромбин) и растворения (минуя плазмин) фибринового сгустка и возникновения тромбоэмболических осложнений.

Эти реакции многообразны и обусловлены особенностями строения SARS-CoV-2, состоянием врожденного и адаптивного иммунитета, активацией гуморальных защитных систем организма, выделением многочисленных триптаз в кровь, в том числе увеличением трипсина в биологических жидкостях (Magro et al., 2020; Bumiller-Bini et al., 2021; Conway, Prydzial, 2022). В этом разделе мы обобщаем имеющуюся литературу о роли тромбоцитов в осуществлении альтернативных механизмов системы гемостаза.

#### *Тромбоциты и шиповидный белок S SARS-CoV-2*

В настоящее время известно, что альтернативные пути развития и регуляции системы гемостаза и тромбообразования связаны с влиянием шиповидного белка S и папаиноподобной протеазы SARS-CoV-2. Шиповидный белок S непосредственно влияет на развитие гиперкоагуляции, наблюдаемой у пациентов с COVID-19. Он вызывает



**Рис. 4.** Упрощенная диаграмма коагуляции в норме и точки приложения шиповидного белка S (по: Grobbelaar et al., 2021, с изменениями). Внутренний (1А) и внешний (1В) пути сходятся в общий путь (1С). Эти пути приводят к превращению растворимого фибриногена в нерастворимый фибрин, катализируемый тромбином. (2) Активатор тканевого плазминогена (tPA) или активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) превращают плазминоген в плазмин. Фибринолитическая система в норме регулирует путь коагуляции и способствует успешному лизису нерастворимого фибринового сгустка. (3) Плазмин расщепляет фибрин на продукты деградации фибрина, включая D-димер. (4) Протеин С и тромбомодулин регулируют коагуляцию: тромбин связывается со своим рецептором тромбомодулином, что приводит к появлению активированного протеина С (APC). Затем APC ингибирует как Va, так и VIIIa. (5) Нерегулируемые воспалительные молекулы могут мешать экспрессии тканевого фактора TF. (6) Дисрегуляция воспалительных молекул может также подавлять тромбомодулин, что приводит к гиперкоагуляции, поскольку активность Va и VIIIa в этом случае недостаточно модулируется. (7) При добавлении шиповидного белка S1 в плазму здоровых людей эти процессы нарушаются. (8) При этом белок S1 переводит фибриноген в фибрин, минуя тромбин, протромбин в тромбин, и плазминоген – в плазмин через активацию uPA. Одновременно дисрегуляция воспалительных молекул в кровообращении может ингибировать фибринолиз за счет повышения концентрации ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1). Повышенная концентрация PAI-1 блокирует действие tPA и в конечном итоге приводит к нарушению регуляции системы свертывания крови. (9) В то же время α-антиплазмин ингибирует плазмин и тормозит фибринолиз, резко усиливая процессы тромбообразования.

ет аномальное свертывание как в очищенном флуоресцентном фибриногене, так и в плазме здоровых людей, бедной тромбоцитами. Эти плотные отложения обнаружены в мазках, обработанных спайковым белком, и при добавлении тромбина. С помощью масс-спектрометрического анализа удалось показать, что внесение шиповидного белка S в здоровую бедную тромбоцитами плазму приводит к структурным изменениям β- и γ-фибрина/фиб-

риногена, C3-компонента комплемента и протромбина (Grobbelaar et al., 2021) (рис. 4).

Между тромбоцитами и шиповидным белком S SARS-CoV-2 существуют определенные взаимосвязи. Так, установлено (Li et al., 2022), что SARS-CoV-2 взаимодействует с тромбоцитами через уникальный рецептор CD42b. При этом у больных с тяжелым течением COVID-19 тромбоциты под влиянием SARS-CoV-2 через молекулы

CD40L, вступающие во взаимодействие с CD40, активируют моноциты, а также связывание P-селектина с гликопротеиновым лигандом PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1). Этот механизм зависит от спайкового белка SARS-CoV-2, но не связан с путем заражения ACE2. Описанные процессы осуществляются независимо от того, существует ли спайк в виде растворимого белка или в составе оболочки вируса. Более того, тромбоциты, активированные SARS-CoV-2, индуцируют дифференцировку моноцитов в направлении провоспалительного фенотипа, который характеризуется более высокой экспрессией CD86, HLA-DR и IL-1 $\beta$ . Следовательно, SARS-CoV-2 может напрямую активировать тромбоциты, а связывание шиповидного белка с CD42b должно способствовать усилению протромботических влияний.

Тромбоциты могут напрямую взаимодействовать с SARS-CoV-2, перенося вирус. Но также тромбоциты способствуют поглощению вируса за счет секреции субтилизиноподобной пропротеинконвертазы фурина. Расщепление шиповидного белка SARS-CoV-2 фурином усиливает способность связывания и проникновения вируса в различные типы клеток (Rohlfing et al., 2021).

В кровотоке больных COVID-19, находящихся в критическом состоянии, обнаружена РНК SARS-CoV-2, что связано с гиперактивностью тромбоцитов. Тромбоциты экспрессируют ACE2-рецептор клетки-хозяина для SARS-CoV-2 и TMPRSS2 – сериновую протеазу, праймирующую белок S. SARS-CoV-2 и его спайк-белок непосредственно повышают активацию тромбоцитов, сопровождаемую усилением агрегации тромбоцитов, связыванием PAC-1, экспрессией CD62P, секрецией и высвобождением  $\alpha$ - и плотных гранул, а также ретракцией сгустка. Спайк-белок усиливает образование тромбов у мышей дикого типа при переливании трансгенных тромбоцитов hACE2. Кроме того, SARS-CoV-2 и его шиповидный белок напрямую стимулируют тромбоциты, способствуя высвобождению тромбоцитарных факторов, секреции воспалительных агентов и образованию лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов. Рекомбинантный человеческий белок ACE2 и моноклональное антитело против спайк-белка могут ингибировать активацию тромбоцитов, вызванную спайковым белком S (Zhang Y. et al., 2020).

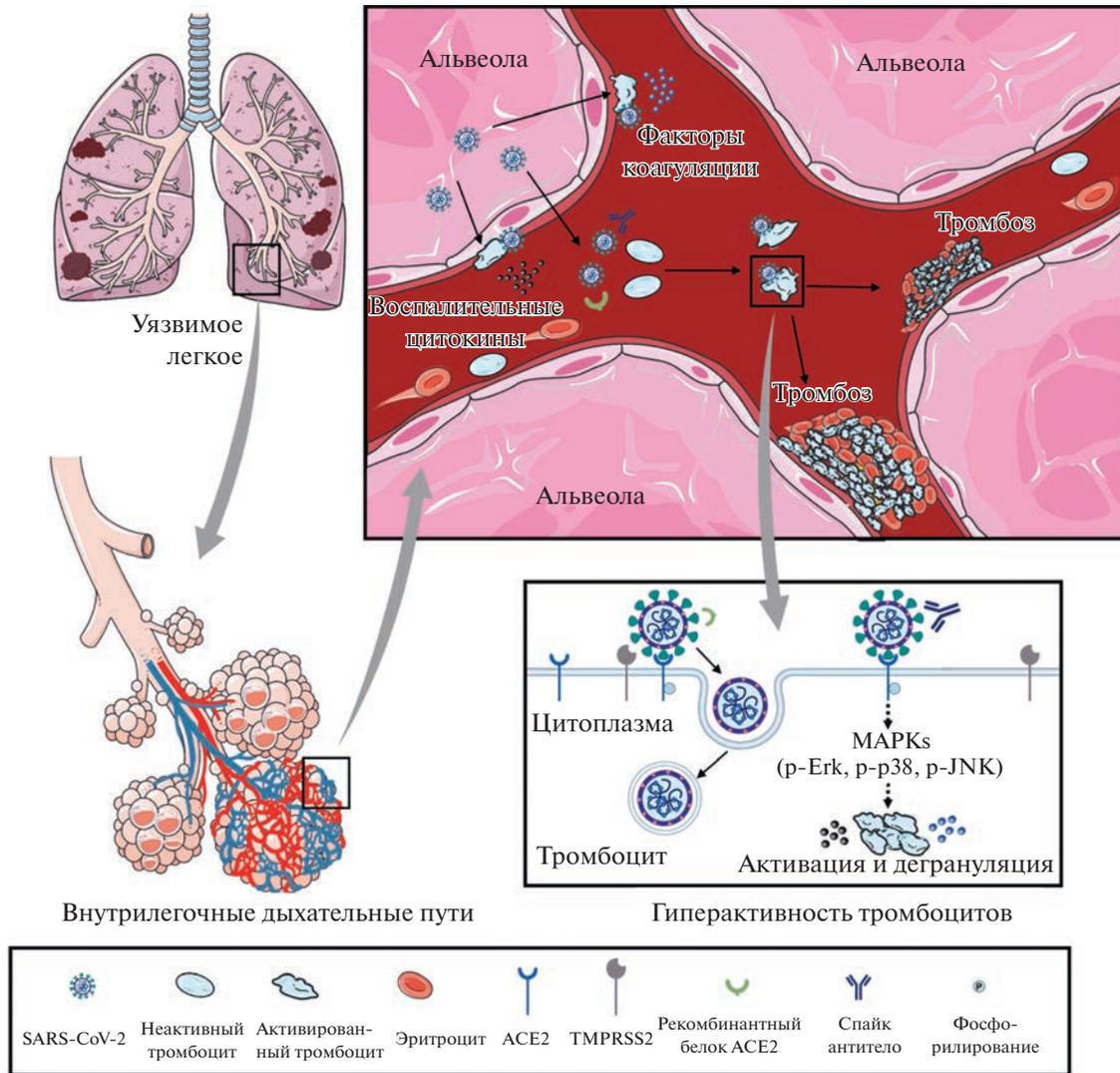
Необходимо отметить, что SARS-CoV-2 и его шиповидный белок напрямую стимулируют активацию FV и FXIII, а также образование лизофосфатидиловой кислоты LPA, что способствует тромбообразованию (Zhang Y. et al., 2020). Из представленных данных невольно напрашивается вывод, что шиповидный белок S способен в обход тромбина не только воздействовать на фибриноген (Grobbelaar et al., 2021), но и активиро-

вать плазменные факторы свертывания крови (Zhang Y. et al., 2020).

SARS-CoV-2 из альвеол связывает и активирует тромбоциты, что усиливает тромбообразование и воспалительную реакцию в капиллярах, а впоследствии способствует развитию ДВС и ОРДС. Спайковый белок SARS-CoV-2 связывается с ACE2 и фосфорилирует ACE2, что приводит к усилению передачи сигналов MAPK (фосфорилирование Erk, p38 и JNK) и последующей активации тромбоцитов, высвобождению из них факторов свертывания крови и секреции воспалительных цитокинов (рис. 5). Эти реакции подавляются рекомбинантным человеческим белком ACE2 и моноклональным антителом против шиповидного антитела (центральная иллюстрация).

У 30.4% пациентов с тяжелым течением COVID-19 обнаружен высокий уровень шиповидного белка. *In vitro* активация эндотелиальных клеток белком S1 через ACE2 нарушает передачу сигналов аденозин-монофосфат активируемой протеинкиназы AMPK, что из-за повышенной экспрессии адгезивных молекул приводит к усиленному рекрутированию лейкоцитов и дефициту антикоагулянта тромбомодулина. S1-индуцированный провоспалительный фенотип, наряду с образованием C3a и C5a, приводит на эндотелиальных клетках к обильному отложению C3 и C5b-9, что еще больше усиливает S1-индуцированную активацию комплемента. Функциональная блокада ACE2 или ингибирование комплемента останавливают образование S1-индуцированных агрегатов из тромбоцитов, ограничивая на эндотелиальных клетках экзцитоз и экспрессию vWF и P-селектина. Следовательно, S1, полученный из SARS-CoV-2, сам по себе достаточен для распространения воспалительных и тромботических процессов в микроциркуляторном русле, усиленных системой комплемента, и дополнительно усугубляет тромбоэмболические осложнения COVID-19 (Perico et al., 2022). К приведенным фактам следует добавить, что активация системы комплемента и образование фрагментов C3a и C5a напрямую способны переводить фибриноген в фибрин, минуя тромбин (Magro et al., 2020).

Существует тесная связь между шиповидным белком S, системой комплемента и тромбоцитами. Спайковый белок SARS-CoV-2 (субъединицы S1 и S2) напрямую активирует альтернативный путь комплемента. Фрагменты C3 и C5b-9 откладываются на клетках-мишенях TF1PIGAnull, а фактор комплемента Bb увеличивается в супернатанте клеток, обработанных шиповидным белком S. Ингибирование C5 предотвращает накопление C5b-9 на клетках, а связывание фактора D предотвращает накопление и C3c, и C5b-9. Добавление фактора H смягчает атаку комплемента на вирус. Кроме того, шиповидный белок SARS-CoV-2 преобра-



**Рис. 5.** Сводные схемы, иллюстрирующие активацию тромбоцитов SARS-CoV-2 и усиление тромбоза при COVID-19 (по: Zhang Y. et al., 2020, адаптировано).

зует неактивирующие поверхности в активирующие, предотвращая инактивацию конвертазы APC (activated protein C) клеточной поверхностью. Активация протеина С может объяснить многие клинические проявления (микроангиопатия, тромбоцитопения, повреждение почек, тромбозы и тромбофилия) COVID-19. При этом не блокируется восходящая активация комплемента в ответ на шиповидные белки SARS-CoV-2 (Yu et al., 2020).

Доказано, что белок S вызывает динамическую деформацию тромбоцитов, что может приводить к их необратимой активации. С помощью клеточной криоэлектронной томографии на поверхности тромбоцитов выявлен хорошо визуализируемый S-белок, приводящий к образованию филоподий. Оказалось, что белок S распознает интегрин  $\alpha v \beta 3$ . Более того, стохастическая активация тромбоцитов обусловлена слабым взаи-

модействием S-белка с интегрином  $\alpha v \beta 3$ , что должно быть связано с патогенезом COVID-19 и возникновением тяжелых коагулопатий (Kuhn et al., 2022).

Как показывают исследования (Bye et al., 2021), иммунные комплексы, содержащие рекомбинантный спайковый белок SARS-CoV-2 и IgG против спайка, усиливают опосредованный тромбоцитами тромбоз и активацию vWF, но только тогда, когда состояние гликозилирования домена Fc изменено так, чтобы соответствовать аберрантному гликозилированию, выявляемому у пациентов с тяжелым течением COVID-19. Оказалось, что обнаруженная активация зависит от Fc $\gamma$ RIIA.

Доказано, что антигепариновый тромбоцитарный фактор PF4 и домен-связывающий рецептор spike-RBD могут вступать во взаимодействие друг с другом. Эта взаимосвязь двух белков способствует генерации анти-PF4-антител, а их связывание с

spike-RBD из-за их высокой экспрессии ACE2 – усилению агрегации тромбоцитов. Безусловно, подобные взаимосвязи должны усилить процесс тромбообразования (Passariello et al., 2021).

Представленные в этом разделе данные указывают на то, что тромбоциты опосредовано – через шиповидный белок S SARS-CoV-2 – могут принимать участие в альтернативном пути перехода фибриногена в фибрин, минуя образование тромбина, а также активируя плазменные факторы свертывания крови.

#### *Тромбоциты и система комплемента*

Согласно данным исследований *in silico* и *in vitro* (Tiwari et al., 2020), спайк-белок S SARS-CoV-2 способен взаимодействовать с C3 и активирует его протеолитический процессинг. При этом C3 гидролизуется в C3a и C3b, расщепляющий C5 на C5a и C5b. В дальнейшем C3a и C5a индуцируют продукцию воспалительных цитокинов. Кроме того, C3a, C5a, а также МАК (мембрано-атакующий комплекс) активируют внешний и внутренний пути свертывания крови. C5a также активирует продукцию IL-6 и TNF- $\alpha$ , что усиливает оба пути коагуляции. Наконец МАК (C5b-9), воздействуя на тромбоциты, способствует высвобождению запятого TF, что усиливает процессы тромбообразования.

Установлено, что активация системы комплемента по лектиновому пути, значительно усиленному у тяжелобольных COVID-19, приводит не только к интенсификации процесса коагуляции по классическому варианту, но и посредством действия протеаз MASP-1 и MASP-2 форсирует образование тромбина и фибрина (Jenny et al., 2015, 2019; Bumiller-Bini et al., 2021). В частности, MASP-2 способна стимулировать расход фибриногена за счет расщепления протромбина с образованием тромбина. В эксперименте при использовании активной MASP-2 в комплексе с маннозсвязывающим лектином MBL (mannose-binding lectin) образующийся тромбин может расщеплять как FXIII, так и фибриноген, а также активировать TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) (Kragup et al., 2007; Frithiof et al., 2021). В то же время MASP-1 активирует протромбин двумя путями, расщепляя R271 или R393. Оба пути приводят к образованию нескольких активных альтернативных форм тромбина. При этом развивающееся тромбовоспаление является результатом активации каскадных систем крови (комплемента, коагуляционной и фибринолитической), которые, действуя совместно, приводят к стимуляции клеток крови (полиморфноядерные лейкоциты, моноциты, тромбоциты) и эндотелиальных клеток. Особо следует отметить, что MASP-1 и MASP-2 не только оказывают влияние на активацию тромбоцитов и расщепление фибрина, но и

активированные тромбоциты и фибрин как *in vitro*, так и *in vivo* стимулируют MASP-1 и MASP-2 (Jenny et al., 2019; Frithiof et al., 2021).

Образуемый фибрин и генерируемый под воздействием плазмина D-димер не только связывают, но и активируют MASP-1 и MASP-2. При этом во время свертывания крови без вмешательства гепарина наступает инактивация антитромбина. Кроме того, MASP-1 и MASP-2 инактивируются C1-INH и связывают этот ингибитор классического пути системы комплемента и тромбина. В присутствии низкомолекулярного гепарина антитромбин и C1-INH являются эффективными ингибиторами MASP-1. Так осуществляется взаимосвязь между системой комплемента, свертыванием крови, действием антикоагулянтов и фибринолизом (Kozarcanin et al., 2016).

Доказано, что у пациентов с COVID-19 во многих органах имеются отложения фрагментов комплемента. Так, повреждение капилляров в легких у умерших от дыхательной недостаточности сопровождается в микроциркуляторном русле обширными отложениями C5b-9, C4d и MASP-2. Аналогичная картина обнаружена на коже пациентов с сетчатыми и пурпурными поражениями. Более того, C4d и C5b-9 совместно локализуются с S-белком SARS-CoV-2 в сосудистой сети легких и кожи (Magro et al., 2020). При вскрытии трупов больных продемонстрировано сильное окрашивание C5b-9 на апикальной щеточной каемке эпителиальных клеток канальцев почек с минимальным отложением на клубочках и капиллярах (Diao et al., 2020).

На эндотелиальных клетках и тромбоцитах обнаружены (Lee et al., 2022) агрегаты IgG и IgM, локализованные совместно с фрагментами C1q, C4d и C5b-9, что свидетельствует об активации классического пути системы комплемента. Кроме того, выявлены отложения C1q и C3 в макрофагах и эндотелиальных клетках, которые индуцируются спайковым белком SARS-CoV-2.

Установлено (Cugno et al., 2021; Ma et al., 2021; Iba et al., 2023), что при COVID-19 преобладают альтернативные пути активации системы комплемента. У пациентов с COVID-19 обнаружено более высокое содержание компонентов C3, C4 и C5a. У больных с COVID-19 уровень антигена vWF значительно выше, чем у здоровых людей. При этом наблюдается значительная положительная корреляция между анафилотоксинами C3a, C5a и антигеном vWF (Gauchel et al., 2022). При тяжелом течении COVID-19 в крови возрастает содержание серотонина, что свидетельствует о повышенной активации тромбоцитов и их значительной роли в развитии многих разрушительных легочных и внелегочных осложнений, в том числе и тромбоза (Santos et al., 2022).

Тромбоциты могут интернализировать попавший в кровотоки SARS-CoV-2, а вирусная одноцепочечная РНК способна активировать TLR7. В свою очередь TLR7 приводит к высвобождению компонента С3 системы комплемента из  $\alpha$ -гранул тромбоцитов. Одновременно С3 стимулирует нетоз, а высвобождаемая нейтрофильная ДНК захватывает вирус, который мог быть пропущен тромбоцитами. Тромбоциты также могут контролировать степень нетоза, высвобождая в результате сигнала, исходящего от нейтрофилов, GM-CSF. Повреждение инфекцией ткани провоцирует высвобождение TF, ведя к образованию тромбина и к переходу фибриногена в фибрин, а также к агрегации тромбоцитов и к активации С3. При этом воспалительные цитокины IL-1b или IL-6 могут дополнительно способствовать агрегации тромбоцитов, что усиливает формирование тромба (Kourepova, 2020).

ADAMTS13 – металлопротеиназа, специфически расщепляющая необычно большие мультимеры vWF (UL-vWF), вновь высвобождаемые из эндотелиальных клеток сосудов. Отношение активности ADAMTS13 к антигену vWF (ADAMTS13/vWF) и показатели альтернативного пути активации системы комплемента (С3а и sC5b-9) связаны с тяжестью течения COVID-19. Соотношение ADAMTS13/vWF у пациентов с тяжелой формой COVID-19 обычно умеренно снижено. При цитокиновом шторме IL-8 и TNF- $\alpha$  стимулируют высвобождение vWF из эндотелиальных клеток сосудов; IL-6 ингибирует и продукцию ADAMTS13, и его взаимодействие с vWF, что приводит к локализованному тяжелому дефициту активности ADAMTS13. Тромбоспондин-1 и PF4, высвобождаемые при активации тромбоцитов, связываются с доменом A2 vWF, усиливая таким образом блокаду ADAMTS13. При этом высвобожденные UL-vWF остаются связанными с поверхностью эндотелиальных клеток посредством закрепления с синдеканом-1 в гликокаликсе. Развертывание домена A2 vWF, имеющего высокую гомологию последовательности с фактором комплемента В, позволяет домену связываться с активированным компонентом С3b, обеспечивая платформу для активации комплемента по альтернативному пути. Образующиеся С3а и С5а генерируют NETs, богатые TF и вызывающие смешанный иммунотромбоз (сгустки фибрина и агрегаты тромбоцитов), обычно наблюдаемый у пациентов с тяжелой формой COVID-19 (Fujimura, Holland, 2022).

Согласно данным (Moraes et al., 2022), при COVID-19 из активированных тромбоцитов образуется значительное число циркулирующих микровезикул, а их прокоагулянтная активность влияет на воспалительный процесс. Микровезикулы стимулируют высвобождение провоспалительных цитокинов, вызывая повреждение эндотелия. Образующиеся эндотелиальные везикулы

увеличивают адгезию тромбоцитов к коллагеновым матриксам с последующей активацией моноцитов и значительной продукцией TF, что в конечном итоге ведет к появлению тромбина и тромбообразованию. Одновременно у таких больных наблюдается активация системы комплемента, о чем свидетельствует повышение С4b и последующее его потребление.

Ось С5а/С5аR1 – ключевой игрок в потере эндотелиальной тромборезистентности. У пациентов с тяжелым течением COVID-19, наряду с активацией системы комплемента, спровоцированной коронавирусной инфекцией, развивается ОРДС. При этом С5а, добавленный к нормальной человеческой сыворотке, приводит к предтромбозу, вызывая RalA-опосредованный экзоцитоз vWF и Р-селектина из телец Вайбеля–Паладе, что способствует дальнейшему связыванию vWF с эндотелием, а также адгезии и агрегации тромбоцитов. Представленные результаты (Varatharajah, Rajah, 2020) подтверждают, что С5а/С5аR1 является протромбогенным эффектором при COVID-19.

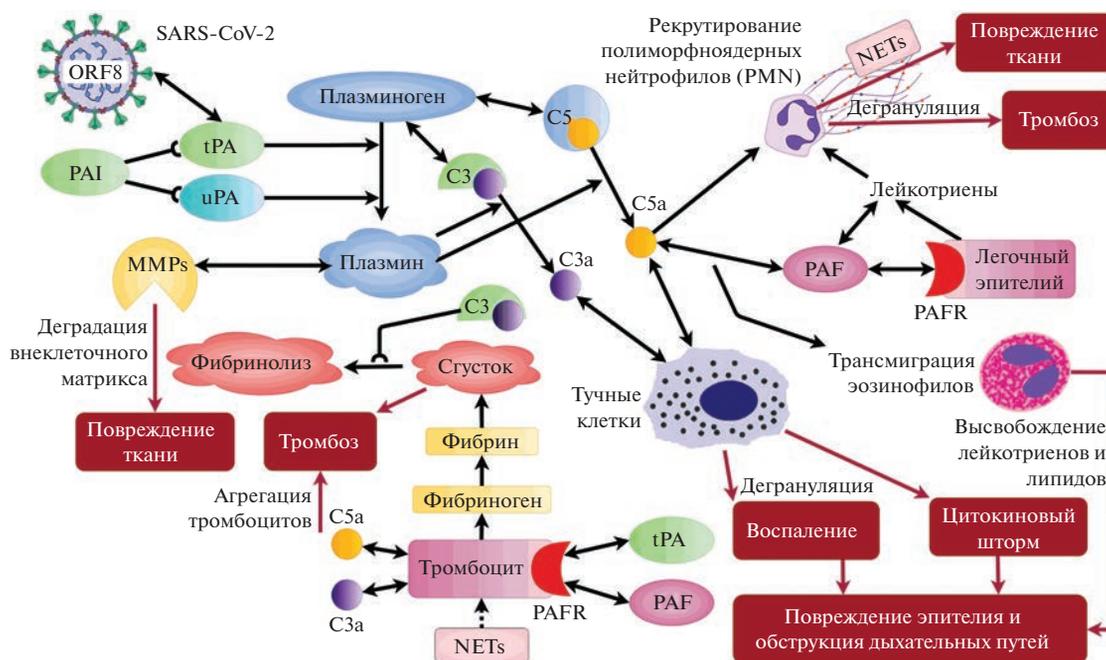
На основании исследований и изучения данной литературы предложена (Mukund et al., 2020) следующая схема взаимосвязи между фибринолизом, системой комплемента и активацией тромбоцитов при COVID-19 (рис. 6).

Все приведенные данные свидетельствуют о чрезвычайно важной роли тромбоцитов в возникновении тромбоэмболических состояний при COVID-19. При этом они не позволяют говорить о том, что тромбоциты напрямую способны воздействовать на фибриноген, минуя тромбин. Однако тромбоциты через лектиновый путь активации системы комплемента и образующиеся фрагменты С3а и С5а могут опосредованно, минуя образование тромбина, способствовать формированию фибринового сгустка (Jenny et al., 2015, 2019; Bumiller-Bini et al., 2021).

#### *Тромбоциты и цитокиновый шторм*

Известно, что ОРДС, вызванный инфекцией SARS-CoV-2, возникает в результате цитокинового шторма. Синтез и секреция воспалительных цитокинов и хемокинов, наблюдаемые в легких при аутопсии, обусловлены активацией моноцитов, макрофагов, дендритных клеток, Т-лимфоцитов, тромбоцитов, что приводит к полиорганной недостаточности и даже летальным исходам. При этом значительно активируются цитокины IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и хемокины CCL2, CCL3 и CCL5, что и представляет угрозу существованию организма (Harrison, 2020; Allaoui et al., 2021).

Цркулирующие тромбоциты пациентов содержат SARS-CoV-2 в четкой корреляции с летальным исходом. Тромбоциты, содержащие SARS-CoV-2, происходят из мегакариоцитов (МК) костного моз-



**Рис. 6.** Схематическое изображение взаимосвязи между плазмином, системой комплемента и активацией тромбоцитов при действии SARS-CoV-2 (по: Mukund et al., 2020, адаптировано). Преобразование плазминогена опосредуется либо tPA, либо uPA, активность которых может ингибироваться PAI-1 или PAI-2. Превращение плазминогена в активный плазмин имеет решающее значение для разрушения тромба. Неспособность разрушить сгустки (недостаточный фибринолиз) приводит к тромбозу. Фибринолиз может ингибироваться компонентом комплемента C3. Компоненты C3 и C5 могут активироваться плазмином в дополнение и к классическому лектиновому пути, и к альтернативному. Анафилактоксины C3a и C5a взаимодействуют и стимулируют дегрануляцию тучных клеток, высвобождая гистамин, цитокины, лейкотриены, GM-CSF и несколько протеаз, повреждающих ткани. Чрезмерная стимуляция каскада комплемента приводит к воспалению, цитокиновому шторму, провоцирующему повреждение эпителия, и обструкции дыхательных путей, проявляющейся в виде ОРДС. Кроме того, C5a и связанный с лейкотриеном PAF являются мощными аттрактантами полиморфноядерных нейтрофилов (PMN) к месту повреждения. Вовлеченные PMN могут высвобождать микробицидные молекулы и образовывать NETs, способствующие повреждению тканей, образованию тромбов и активации тромбоцитов. В то же время PAF вызывает отек легких в моделях острого повреждения легких. Дегрануляция базальной мембраны дополнительно способствует инфильтрации иммунных клеток и повреждению тканей. Деструкция тканей, NETs, PAF, tPA (при избыточной экспрессии), C3a и C5a активируют тромбоциты и усиливают их агрегацию на фибриновом каркасе с образованием сгустка. Тромбы, агрегаты из форменных элементов крови и повреждение тканей приводят к обструкции дыхательных путей, что проявляется в виде ОРДС. Двойные стрелки указывают на взаимосвязь.

га и легких. Такие зараженные МК обнаружены при вскрытии умерших, страдавших COVID-19. Соответственно, МК, подвергающиеся укороченной дифференцировке и экспрессирующие противовирусные РНК IFITM1 и IFITM3 (в качестве признака распознавания вируса), обогащены циркулирующей смертельно опасного SARS-CoV-2. Инфицированные МК достигают легких одновременно с цитокиновым штормом, связанным с МК, богатыми VEGF, PDGF и воспалительными молекулами, что приводит к летальному исходу. Макрофаги легких захватывают тромбоциты, содержащие SARS-CoV-2. Вирус, находящийся в тромбоцитах, заразен, поскольку распространяет инфекцию на макрофаги. В целом тромбоциты, содержащие инфекционный SARS-CoV-2, изменяют патогенез COVID-19 и представляют собой мощный маркер летального исхода. Клиническое нацеливание на тромбоциты может одновременно предотвратить

распространение вируса, образование тромбов и обострение воспаления, а также повысить выживаемость при COVID-19 (Zhu et al., 2022).

Согласно представлениям (Gu et al., 2021), патологическая гиперактивация тромбоцитов сопровождается чрезмерным высвобождением микровезикул и гранул, что способствует усилению тромбоза и цитокинового шторма (локального и циркулирующего). При этом выраженная активация тромбоцитов приводит к образованию тромбоцитарно-лейкоцитарных конъюгатов (прежде всего нейтрофилов), апоптозу и/или агрегации тромбоцитов, что в свою очередь сопровождается усилением тромбоза и воспаления. Наличие нарушений фибринолиза и эндотелиопатии лишь усиливает тромбообразование, что и приводит к опасным для жизни тромбозам и тромбоэмболиям.

Активированные тромбоциты, экспрессируя P-селектин и CD40L на клеточной поверхности,

способны одновременно взаимодействовать с нейтрофилами, высвобождать  $\alpha$ -гранулы и С3, а также различные цитокины, включая CCL2, CCL3, CCL7, IL-1 $\beta$ , IL-7, IL-8 и фактор роста гепатоцитов, и тем самым усиливать цитокиновый шторм и способствовать тромбообразованию (Ye et al., 2020).

Известно, что SARS-CoV-2 связывается с тромбоцитами через рецептор ACE2, после чего вирусный гемагглютинин расщепляется TMPRSS2 и таким образом активирует интернализацию вируса. Такое расщепление запускает активацию тромбоцитов и последующие сигнальные события, ведущие к цитокиновому шторму, агрегации тромбоцитов и образованию агрегатов лейкоциты–тромбоциты. Сочетание цитокинового шторма, активации тромбоцитов, отторжения микровезикул и иммунотромботических событий приводит к нарушению целостности клеток, острому повреждению легких, тромбоэмболиям, полиорганной недостаточности и даже смерти (Allaoui et al., 2021).

Вирус-индуцированные изменения тромбоцитов, нейтрофилов и эндотелиальных клеток – решающие триггеры тромботических осложнений и неблагоприятного течения COVID-19 (Falcinelli et al., 2022). Прямое взаимодействие с вирусом и связанный с ним цитокиновый шторм одновременно запускают активацию клеток в классическом тромбовоспалительном порочном круге.

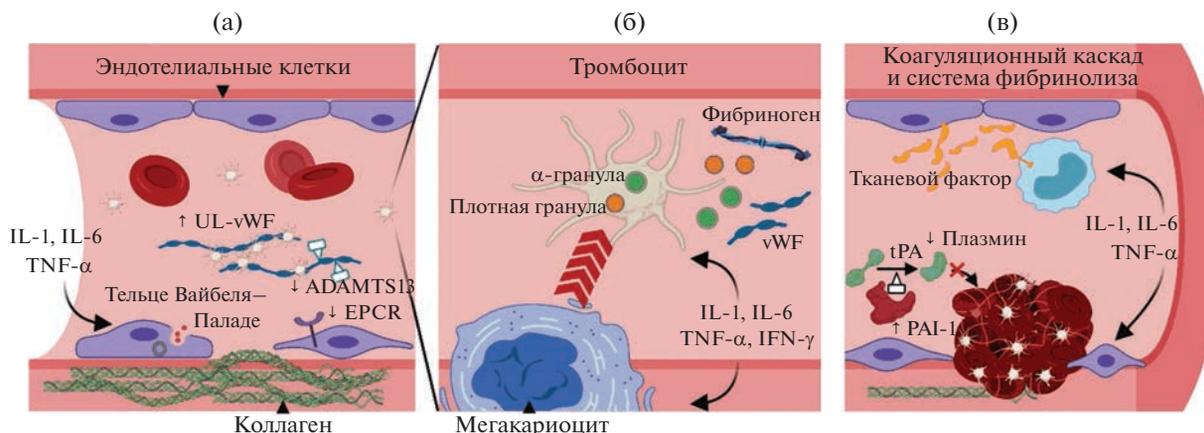
Не вызывает сомнений, что тромботические осложнения как маркеры тяжелого течения COVID-19 связаны с полиорганной недостаточностью и повышенной смертностью. Вместе с тем, тромботические проявления при тяжелой форме COVID-19 обусловлены способностью SARS-CoV-2 проникать в эндотелиальные клетки через ACE2 (McFadyen et al., 2020). Однако у пациентов с COVID-19 последующее воспаление эндотелия, активация комплемента, образование тромбина, рекрутирование тромбоцитов и лейкоцитов, инициация врожденных и адаптивных иммунных ответов (цитокиновый шторм) завершаются иммунотромбозом, что, в конечном итоге, вызывает (микро)тромботические осложнения – поражение глубоких вен, тромбоз, легочную эмболию, инфаркт миокарда и инсульт (Fox et al., 2020; Di Gennaro et al., 2022).

Возникающие под влиянием SARS-CoV-2 тромбозы связаны с эндотелиальной и тромбоцитарной дисфункцией, высвобождением IL-6, TF и vWF (Beura et al., 2021). Все эти соединения, а также образующийся тромбин усиливают активацию тромбоцитов. Агрегация тромбоцитов индуцирует их высокое потребление. В то же время IFN-I, связываясь с TLRs, ингибирует образование мегакариоцитами тромбоцитов. В совокупности все эти процессы приводят к тромбоцитопении. Деградация фибриногена сопровождается образованием D-димера и других тромбогенных

молекул, ведущих к ВТЭ, ДВС-синдрому и тромботической микроангиопатии (Beura et al., 2021).

SARS-CoV-2 вызывает инфильтрацию воспалительных клеток, приводящую к избыточной продукции цитокинов, протеаз, факторов свертывания крови, кислородных радикалов и вазоактивных молекул, что приводит к повреждению эндотелия, к разрушению фиброзной покрышки и к инициации образования тромба. Одновременно возникает вазоконстрикция и активация тромбоцитов за счет напряжения сдвига. В результате развившийся цитокиновый шторм сопровождается секрецией TF без последующего усиления контррегуляторных путей – антитромбина III, активированного протеина C и tPA. Наконец, приток CD4<sup>+</sup> Т-клеток в сердечно-сосудистую систему приводит к увеличению продукции цитокинов, стимулирующих миграцию клеток гладкой мускулатуры в интиму, выработку коллагена и других волокнистых продуктов, что ведет к продвижению липидных полос к выраженным атеросклеротическим поражениям. Прямое повреждение миокарда и цитокиновый шторм, приводящий к дестабилизации ранее существовавших и ускоренному образованию новых бляшек, – два механизма, провоцирующие острый коронарный синдром при COVID-19 (Sheth et al., 2020; Kerch, 2023).

Имеющиеся в настоящее время исследования показывают, что коагулопатия при COVID-19 представляет собой сочетание локального потребления тромбоцитов в легких, ДВС низкой степени и тромботической микроангиопатии. В тяжелых случаях COVID-19 гипервоспаление и цитокиновый шторм являются наиболее существенными факторами, приводящими к эндотелиальной дисфункции, активации тромбоцитов и развитию тромбоемболических осложнений (Vadasz et al., 2020; Xiang et al., 2022). В этой связи интерес представляют различные циркулирующие биомаркеры воспалительной коагуляции, участвующие непосредственно в свертывании крови, в особенности: фибрин/фибриноген, D-димеры, P-селектин, UL-vWF, растворимый тромбомодулин и TF – усиливающие воспаление и гиперкоагуляцию у тяжелобольных COVID-19. Центральное место в активности этих биомаркеров занимают их рецепторы и сигнальные пути на эндотелиальных клетках, тромбоцитах, моноцитах и эритроцитах (Allaoui et al., 2021). Важно также отметить, что гиперактивированный фенотип тромбоцитов, наряду с признаками цитокинового шторма, высоким уровнем P-селектина, D-димера, а также повышенная концентрация фибриногена, vWF и тромбоцитопения могут считаться типичными биомаркерами, характерными для поздней стадии прогрессирования COVID-19 у критически больных пациентов (Безрезовская и др., 2022; Barale et al., 2021).



**Рис. 7.** Патогенез коагулопатии, связанной с цитокиновым штормом (по: Barale et al., 2021, адаптировано). (а) Провоспалительные цитокины IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$  могут стимулировать эндотелиальные клетки к секреции тельц Вайбеля–Паладе, которые содержат сверхбольшой vWF (UL-vWF) и P-селектин, – оба необходимы для прикрепления тромбоцитов. Более того, цитоскелеты эндотелиальных клеток перестраиваются, чтобы обнажить прокоагулянтный коллаген. Экспрессия белков-антикоагулянтов – EPCR (рецепторов эндотелиального белка С) и ADAMTS13 – также подавляется. (б) Цитокиновый шторм, в том числе IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  оказывают влияние на количество и качество тромбоцитов. Созревание мегакариоцитов ускоряется, что приводит к большему количеству тромбоцитов. Эти цитокины могут также стимулировать высвобождение плотных гранул и  $\alpha$ -гранул, содержащих важные субстраты свертывания крови – фибриноген и vWF. (в) Цитокины IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$  могут повышать экспрессию ТФ эндотелиальных клеток и моноцитов. Кроме того, фибринолитическая система ингибируется повышенной экспрессией PAI-1, который деактивирует tPA и приводит к уменьшению концентрации плазмينا, ADAMTS13, дезинтегрин, металлопротеиназы, интерферона.

Существует мнение (Gao et al., 2021), что цитокиновый шторм может быть лишь верхушкой айсберга, и представления о механизмах его возникновения и протекания следует использовать с осторожностью для объяснения патогенеза ухудшения течения COVID-19, который может быть более сложным и связанным в значительной мере с воспалением, иммунитетом, свертыванием крови и функциями многих органов. Но наш опыт (Кузник, Хавинсон, 2020; Кузник и др., 2020, 2022), а также приводимые в данном фрагменте обзора сведения говорят об обратном. Цитокиновый шторм – основание, на котором зиждется большинство сдвигов, в том числе и активация тромбоцитов, развитие гиперкоагуляции и тромбоэмболических осложнений.

С учетом множества аспектов цитокинового шторма предложена (Wang, Doran, 2021) следующая схема взаимодействия лейкоцитов и тромбоцитов в механизме возникновения гиперкоагуляции и тромбоза при COVID-19 (рис. 7).

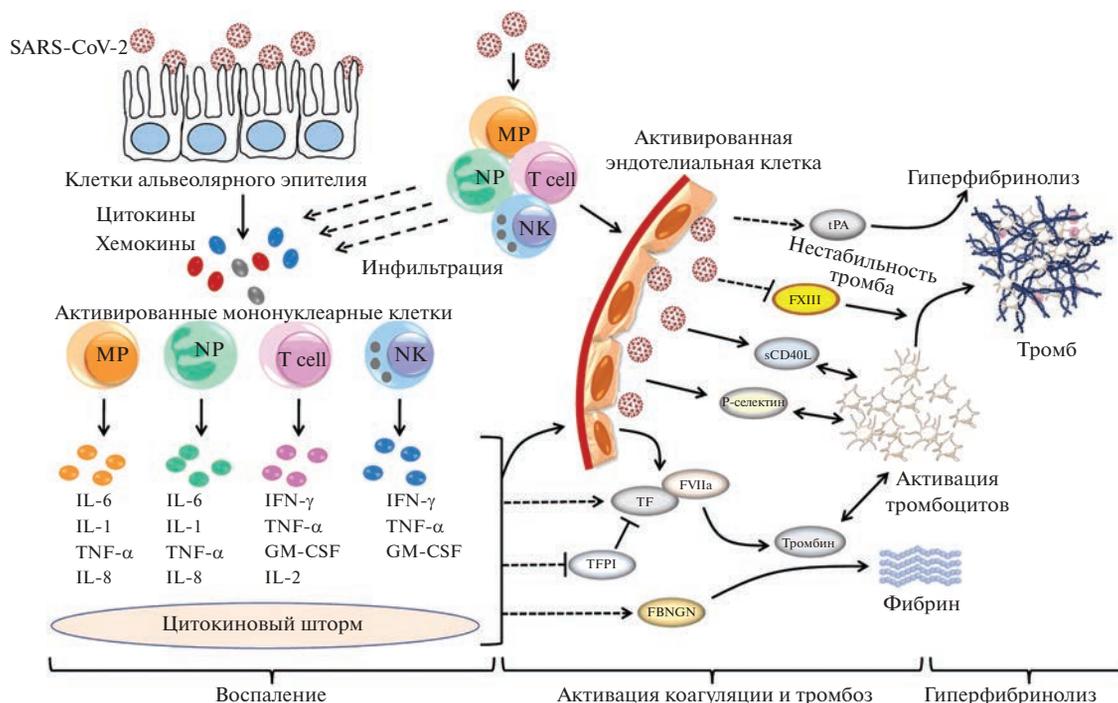
Все представленные данные свидетельствуют о том, что тромбоцитам принадлежит существенная доля в формировании у критических больных COVID-19 цитокинового шторма. При этом гиперпродукция провоспалительных цитокинов ведет к активации тромбоцитов и к усиленному повреждению эндотелиальных клеток, что усугубляет процессы адгезии и агрегации тромбоцитов, и, следовательно, к развитию тромбоза. Все это может через шиповидный белок S SARS-CoV-2

способствовать развитию альтернативных механизмов гиперкоагуляции и тромбоэмболий.

#### Тромбоциты и лейкоциты

Взаимодействие тромбоцитов и лейкоцитов у больных COVID-19 значительно усиливает процесс свертывания крови и нередко приводит к тромбоэмболическим осложнениям, полиорганной недостаточности и летальному исходу. P-селектин – важный рецептор для формирования агрегатов тромбоцитов–лейкоцитов – вступает во взаимодействие с PSGL-1, обеспечивая адгезию активированных тромбоцитов к лейкоцитам. Тромбоцитарно-нейтрофильные и тромбоцитарно-моноцитарные агрегаты, являясь *in vivo* чувствительными индикаторами активации тромбоцитов, у пациентов с COVID-19 значительно повышены (Middleton et al., 2020). Аналогичный результат – значительное увеличение числа тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов – наблюдается при обработке SARS-CoV-2 и шиповидным белком S *in vitro* цельной крови здоровых людей (Zhang S. et al., 2020).

При внедрении SARS-CoV-2 в организм хозяина наблюдается усиленная реакция со стороны защитных систем, сопровождаемая aberrантной активацией нейтрофилов, особенно в легких. При вскрытии трупов больных COVID-19 обнаружена нейтрофильная инфильтрация легочных капилляров, острый капиллярит с отложением фибрина, экстравазация нейтрофилов в



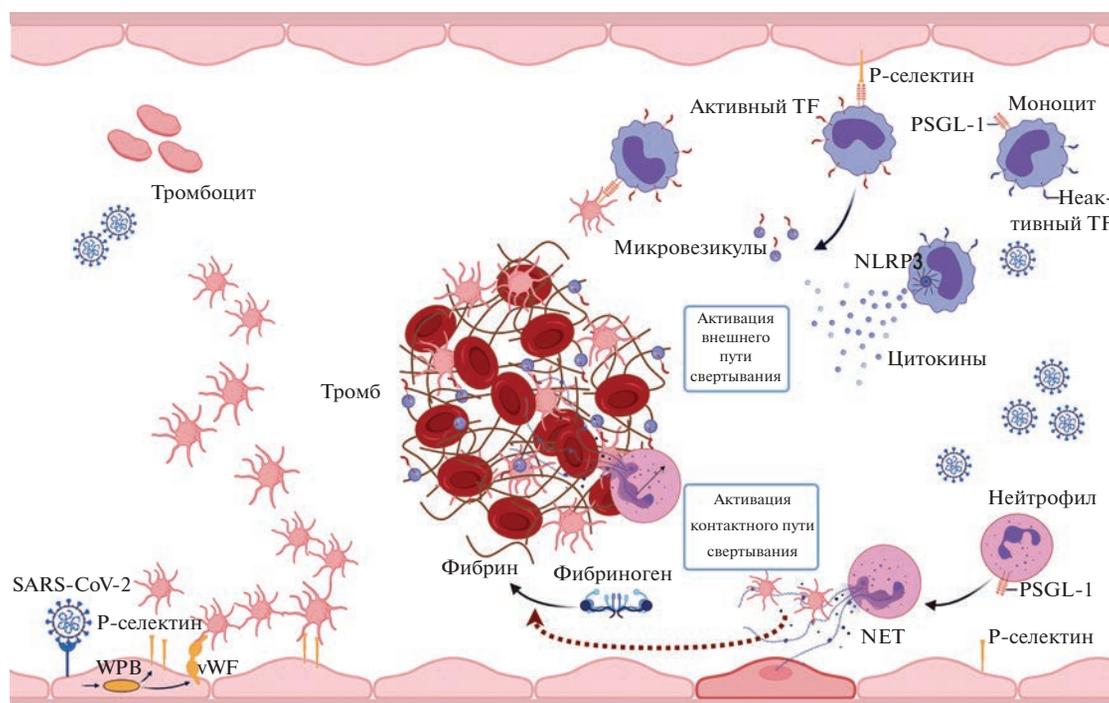
**Рис. 8.** Схема, отражающая роль SARS-CoV-2 в индукции воспаления и тромбоэмболизма. Объяснение в тексте (по: Ahmad et al., 2022, адаптировано).

альвеолярное пространство и нейтрофильный мукозит (Barnes et al., 2020). Нейтрофилия предсказывает плохие исходы у пациентов с COVID-19, а соотношение нейтрофилов и лимфоцитов – независимый фактор риска тяжелого заболевания (Zuo et al., 2020). Кроме того, в сыворотке пациентов с COVID-19 наблюдается повышение уровня NET-специфических маркеров: ДНК миелопероксидазы и цитруллинированного гистона H3 (Mizurini et al., 2021).

Прямое взаимодействие SARS-CoV-2 с рецепторами тромбоцитов ACE2 и CD147 активирует различные внутриклеточные сигнальные пути, приводящие в конечном итоге к С3-индуцированному нетозу. Эти пути активации повышают экспрессию Р-селектина и CD40L и образование тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов. Цитокиновый шторм стимулирует JAK2, STAT3 и NF-κB, что сопровождается гиперактивацией тромбоцитов. В свою очередь активированные лейкоциты через высвобождаемые ими медиаторы могут приводить к гиперактивации тромбоцитов. NETs и их компоненты, кателицидин и хемокины, особенно фактор активации тромбоцитов PAF (platelet-activating factor), взаимодействующие с GPCRs (G-protein-coupled receptors), а также АФК и протеолитические ферменты индуцируют образование фибрина. Все это усиливает активацию тромбоцитов и их прокоагулянтную функцию, что способствует возникновению тромбозов (Ghasezadeh et al., 2022).

При воспалении и тромбоэмболии, вызванных SARS-CoV-2, наблюдается секреция цитокинов и хемокинов, индуцированная повреждением альвеолярных эпителиальных клеток. При этом управляемые иммунные реакции включают в очаг инфекции или воспаления инфильтрацию макрофагов (MP), нейтрофилов (NP), NK-клеток и Т-клеток (рис. 8). Более того, кроме инфицирования клеток альвеолярного эпителия, инфильтрация и активация иммунных клеток усиливают высвобождение медиаторов воспаления, ответственных за возникновение цитокинового шторма. Индукция воспалительной реакции также активирует эндотелиальные клетки и запускает экспрессию TF на множестве клеток и в то же время снижает уровень TFPI (tissue factor pathway inhibitor), препятствующего активации TF. Системное воспаление, вызванное SARS-CoV-2, приводит к высвобождению Р-селектина и sCD40L, которые вместе с тромбином активируют тромбоциты, что еще больше повышает образование тромбина, Р-селектина и sCD40L и обеспечивает положительную обратную связь при активации тромбоцитов и тромбообразовании. Ослабленный уровень FXIII при тяжелом течении COVID-19 может дестабилизировать сгусток и вызвать ВТЭ. Более того, индукция tPA приводит к нарушению фибринолиза и избыточному образованию D-димера (Ahmad et al., 2022).

Инфильтрация провоспалительных моноцитов после инфекции SARS-CoV-2 – показатель



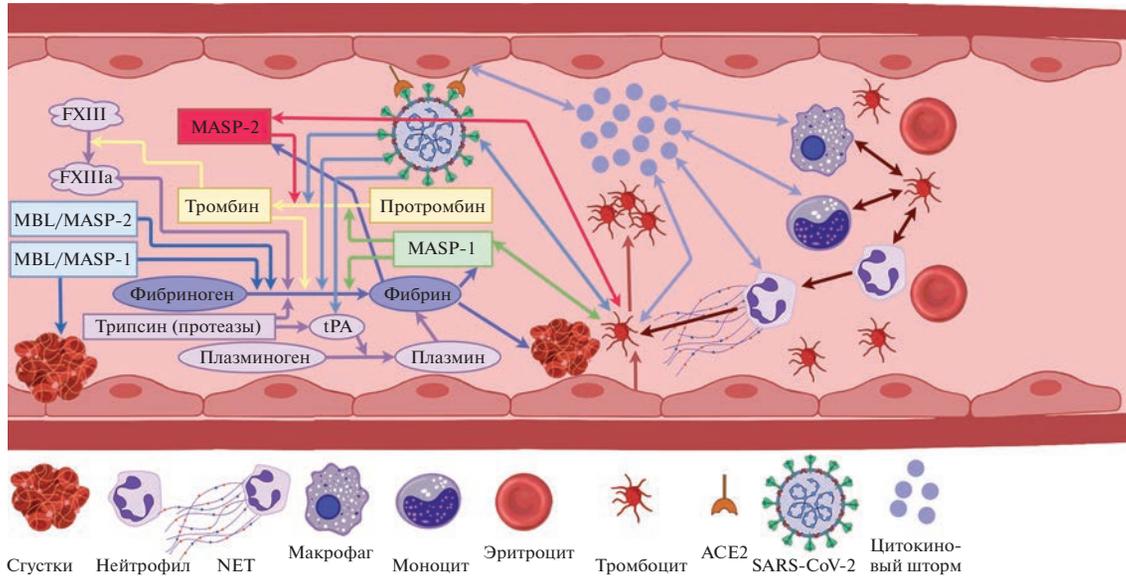
**Рис. 9.** Роль тромбоцитов, нейтрофилов и моноцитов в формировании тромба под влиянием SARS-CoV-2 (WPB – Weibel–Palade bodies). Объяснение в тексте (по: Mizurini et al., 2021, адаптировано).

гипервоспалительной реакции, отвечающей за цитокиновый шторм, наблюдаемый во время острой фазы в тяжелых случаях течения заболевания (Liao et al., 2020). Анализ бронхоальвеолярной жидкости у тяжелых пациентов с COVID-19 выявил повышенное число мононуклеарных фагоцитов, состав которых у таких больных показал более низкую долю тканевых альвеолярных макрофагов и более высокую часть макрофагов, происходящих из воспалительных моноцитов. Но секвенирование одночлечной РНК периферической крови пациентов с COVID-19 выявило сниженное количество неклассических и промежуточных моноцитов и нарушение иммунного ответа миелоидными клетками со сниженной экспрессией цитокинов IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ . Поскольку уровень провоспалительных цитокинов у инфицированных SARS-CoV-2 в плазме повышен, эти результаты позволяют высказать предположение о тканевом происхождении цитокинов в плазме (Arunachalam et al., 2020).

SARS-CoV-2 способствует образованию тромба путем вовлечения самых различных клеток в нити фибрина (Mizurini et al., 2021). Инфекция SARS-CoV-2 запускает врожденный иммунный ответ, что приводит к активации моноцитов, способствующего развитию провоспалительного цитокинового шторма. Этот процесс сопровождается рекрутированием нейтрофилов, эндотелиальных клеток и активацией тромбоцитов. Стимуляция эндотелиоцитов ведет к экспрессии vWF и молекул адгезии, что еще больше усиливает рекрутирова-

ние и активацию тромбоцитов. При этом экспрессия гликопротеина  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, обеспечивающая взаимодействие фибриногена с тромбоцитами и усиливающая их агрегацию и транслокацию P-селектина к поверхности тромбоцитов, приводит к образованию агрегатов тромбоцитов и нейтрофильно-тромбоцитарных агрегатов. Взаимодействие между тромбоцитами, моноцитами и провоспалительными цитокинами усиливает экспрессию TF и высвобождение его в отшнуровавшихся микровезикулах. Затем TF связывается с FVII, активируя коагуляцию. Инфекция SARS-CoV-2 может активировать воспаление NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3), что сопровождается увеличением продукции IL-1 $\beta$  и, следовательно, гиперкоагуляцией. SARS-CoV-2-опосредованный цитокиновый шторм способствует устойчивому рекрутированию и активации нейтрофилов, кульминацией которого является образование NETs и формирование тромба (рис. 9).

В настоящее время трудно решить вопрос, предшествует ли при COVID-19 активация тромбоцитов образованию NETs или тромбоциты напрямую способствуют развитию имунотромбоза со всеми вытекающими отсюда последствиями. Не исключено, что нейтрофилы сначала действуют путем стимуляции образования NETs и инициируют последующий коагуляционный каскад. Наблюдаемая нейтрофилия, а также корреляция между маркерами NETs и коагулопатией подтверждают эту схему. Тем не менее, тромбоциты так-



**Рис. 10.** Альтернативный механизм развития гиперкоагуляции и тромбообразования при COVID-19 (оригинальная схема). Объяснение в тексте.

же способны активироваться вирусом. Логично предположить, что оба каскада влияют друг на друга, поскольку и нейтрофилы, и тромбоциты могут вступать в контакт с вирусными частицами и представляющими опасность продуктами разрушения клеток – DAMPs, а также усиливать цитокиновый шторм, который у тяжелобольных COVID-19 проявляется острыми системными воспалительными симптомами с вторичной полиорганной дисфункцией (Wienkamp et al., 2022).

Полагают (Ahmed et al., 2020), что эндотелиальная дисфункция, активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы с высвобождением PAI-1, активированные тромбоциты, а также цитокиновый шторм, сопровождаемый резким увеличением концентрации провоспалительных агентов – IL-6, IL-10 и TNF- $\alpha$ , вносят существенный вклад в тромбообразование. При этом активируются нейтрофилы, увеличивается число NETs, возрастает концентрация триптаз, в том числе трипсина, что в конечном итоге приводит не только к развитию гиперкоагуляции по классическому пути, но и к альтернативным механизмам (минуя образование тромбина) возникновения тромбоза.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в обзоре данные свидетельствуют о том, что SARS-CoV-2, вызвавший пандемию COVID-19, постоянно развивается и быстро распространяется среди бессимптомных носителей, что увеличивает его угрозу для населения всего мира. Вирион коронавируса состоит из протеинов нуклеокапсида мембраны, оболочки и шиповидного белка S. Проникновение и прикрепление

вируса к мембране клетки-хозяина опосредуются наличием шиповидного белка S, вступающего во взаимосвязь с рецептором ACE2. После внедрения вируса его ферментативная активность снижается, что приводит к повышению проницаемости сосудов, экспрессии TF и других факторов свертывания крови в эндотелии, лейкоцитах и тромбоцитах. В ответ на внедрение SARS-CoV-2 наступает активация системы комплемента и развивается цитокиновый шторм, характеризующийся высоким уровнем провоспалительных цитокинов и хемокинов, приводящий в конечном итоге у тяжелобольных COVID-19 к развитию тромбоангиопатии (иммунотромбозу).

Наряду с классическим механизмом процесса свертывания крови (внешний и внутренний пути), при внедрении в организм хозяина SARS-CoV-2 описаны и альтернативные пути (минуя тромбин) регуляции системы гемостаза и тромбообразования, связанные в первую очередь с влиянием шиповидного белка S и папаиноподобной протеазы. Белок S непосредственно влияет на развитие гиперкоагуляции, наблюдаемой у пациентов с COVID-19. Он вызывает аномальное свертывание как в очищенном флуоресцентном фибриногене, так и в бедной тромбоцитами плазме. С помощью масс-спектрометрического анализа удалось показать, что внесение шиповидного белка S в здоровую бедную тромбоцитами плазму приводит к структурным изменениям  $\beta$ - и  $\gamma$ -фибрина/фибриногена, C3-компонента комплемента и протромбина. Альтернативный путь свертывания крови обусловлен металлопротеиназами MASP-1 и MASP-2, являющимися активаторами системы комплемента, отношением MBL к MASP-1

и MASP-2 (MBL/MASP-1 и MBL/MASP-2), а также трипсином и другими протеазами. Наконец, через tPA белок S способен усиливать переход плазминогена в плазмин, что может приводить к развитию гиперфибринолиза.

Далеко не последняя роль в возникновении тромбоэмболических осложнений принадлежит тромбоцитам, на поверхности которых разыгрываются процессы свертывания крови по внутреннему механизму. В процессе реакции высвобождения тромбоциты выбрасывают из цитоплазмы α- и плотные гранулы, содержащие воспалительные цитокины и хемокины, что усиливает цитокиновый шторм и, следовательно, тромбообразование. Кроме того, тромбоциты косвенно — через воздействие на шиповидный белок S и MASP-1 и MASP-2, а также через формирование нейтрофильных ловушек — усиливают альтернативный (минуя тромбин) путь регуляции системы гемостаза и тромбообразования. Следует заметить, что эти влияния являются обоюдными, что способствует усилению процесса свертывания крови как по классическому, так и по альтернативному механизму (рис. 10).

Нет никакого сомнения что неудачи антикоагулянтной и дезагрегантной терапии при крайне тяжелых случаях течения COVID-19 отчасти связаны с недостаточным влиянием на альтернативные механизмы свертывания крови и тромбообразования.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все проводимые мероприятия соответствовали этическим стандартам, разработанным на основе Хельсинкской декларации всемирной ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека” с поправками 2008 г. и “Правилами клинической практики в Российской Федерации”, утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Березовская Г.А., Петрищев Н.Н., Волкова Е.В. и др. Поражение сердечно-сосудистой системы при новой коронавирусной инфекции COVID-19 // Кардиология: новости, мнения, обучение. 2022. Т. 10 (4). С. 37–47.  
<https://doi.org/10.33029/2309-1908-2022-10-4-37-47>

Кузник Б.И., Хавинсон В.Х. Влияние тималина на системы иммунитета, гемостаза и уровень цитокинов у пациентов с различными заболеваниями. Перспективы применения при COVID-19 // Врач.

2020. Т. 31 (7). С. 18–26.  
<https://doi.org/10.29296/25877305-2020-07-03>

Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Линькова Н.С. COVID-19: влияние на иммунитет, систему гемостаза и возможные пути коррекции // Усп. физиол. наук. 2020. № 4. С. 51–63.  
<https://doi.org/10.31857/S0301179820040037>

Кузник Б.И., Шаповалов К.Г., Смоляков Ю.Н. и др. Морфологический состав и показатели свертывающей системы крови у пациентов среднего и пожилого возраста с COVID-19 при лечении тоцилизумабом и тималином // Усп. геронтол. 2022. Т. 35 (3). С. 368–373.  
<https://doi.org/10.34922/AE.2022.35.3.006>

Кузник Б.И., Ройтман Е.В., Цыбиков Н.Н. и др. Полипотентные механизмы регуляции системы гемостаза и тромбообразования при COVID-19 // Тромбоз, гемостаз, реология. 2023. № 2. (в печати)

Хавинсон В.Х., Кузник Б.И. Осложнения у больных COVID-19. Предполагаемые механизмы коррекции // Клин. мед. 2020. Т. 98 (4). С. 256–265.

Ackermann M., Verleden S.E., Kuehnel M. et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in COVID-19 // N. Engl. J. Med. 2020. V. 383 (2). P. 120–128.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2015432>

Ahmad F., Kannan M., Ansari AW. Role of SARS-CoV-2-induced cytokines and growth factors in coagulopathy and thromboembolism // Cyt. Growth Factor Rev. 2022. V. 63. P. 58–68.  
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.10.007>

Ahmed S., Zimba O., Gasparyan A.Y. Thrombosis in coronavirus disease 2019 (COVID-19) through the prism of Virchow's triad // Clin. Rheumatol. 2020. V. 39 (9). P. 2529–2543.  
<https://doi.org/10.1007/s10067-020-05275-1>

Allaoui A., Khawaja A.A., Badad O. et al. Platelet function in viral immunity and SARS-CoV-2 infection // Semin. Thromb. Hemost. 2021. V. 47 (4). P. 419–426.  
<https://doi.org/10.1055/s-0041-1726033>

Al-Samkari H., Leaf R.S.K., Dzik W.H. et al. COVID-19 and coagulation: bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection // Blood. 2020. V. 136 (4). P. 489–500.  
<https://doi.org/10.1182/blood.2020006520>

Al-Tamimi A.O., Yusuf A.M., Jayakumar M.N. et al. SARS-CoV-2 infection induces soluble platelet activation markers and PAI-1 in the early moderate stage of COVID-19 // Int. J. Lab. Hematol. 2022. V. 44 (4). P. 712–721.  
<https://doi.org/10.1111/ijlh.13829>

Arunachalam P.S., Wimmers F., Mok C.K.P. et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans // Science. 2020. V. 369. P. 1210–1220.  
<https://doi.org/10.1126/science.abc6261>

Barale C., Melchionda E., Morotti A., Russo I. Prothrombotic phenotype in COVID-19: focus on platelets // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22 (24). P. 13638.  
<https://doi.org/10.3390/ijms222413638>

Barnes B.J., Adrover J.M., Baxter-Stoltzfus A. et al. Targeting potential drivers of COVID-19: neutrophil extracellular traps // J. Exp. Med. 2020. V. 217 (6). P. e20200652.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20200652>

Barrett T.J., Cornwell M., Myndzar K. et al. Platelets amplify endotheliopathy in COVID-19 // Sci. Adv. 2021. V. 7 (37). P. eabh2434.  
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abh2434>

- Beura S.K., Panigrahi A.R., Yadav P., Singh S.K.* Phytochemicals as potential therapeutics for SARS-CoV-2-induced cardiovascular complications: thrombosis and platelet perspective // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12. P. 658273. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.658273>
- Bumiller-Bini V., De Freitas Oliveira-Toré C., Carvalho T.M. et al.* MASPs at the crossroad between the complement and the coagulation cascades – the case for COVID-19 // *Genet. Mol. Biol.* 2021. V. 44 (1). P. e20200199. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2020-0199>
- Bye A.P., Hoepel W., Mitchell J.L. et al.* Aberrant glycosylation of anti-SARS-CoV-2 spike IgG is a prothrombotic stimulus for platelets // *Blood.* 2021. V. 138 (16). P. 1481–1489. <https://doi.org/10.1182/blood.2021011871>
- Canaday D.H.* SARS-CoV-2 antibody responses to the ancestral SARS-CoV-2 strain and Omicron BA.1 and BA.4/BA.5 variants in nursing home residents after receipt of bivalent COVID-19 vaccine – Ohio and Rhode Island, September–November 2022 // *MMWR.* 2023. V. 72 (4). P. 100–106. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7204a4>
- Candeloro M., Schulman S.* Arterial thrombotic events in hospitalized COVID-19 patients: a short review and meta-analysis // *Semin. Thromb. Hemost.* 2023. V. 49 (1). P. 47–54. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1749661>
- Chen J.M.* Novel statistics predict the COVID-19 pandemic could terminate in 2022 // *J. Med. Virol.* 2022. V. 94 (6). P. 2845–2848. <https://doi.org/10.1002/jmv.27661>
- Connors J.M., Levy J.H.* COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation // *Blood.* 2020. V. 135 (23). P. 2033–2040. <https://doi.org/10.1182/blood.2020060000>
- Conway E.M., Prydzial E.L.G.* Complement contributions to COVID-19 // *Curr. Opin. Hematol.* 2022. V. 29 (5). P. 259–265.
- Cugno M., Meroni P.L., Gualtierotti R. et al.* Complement activation and endothelial perturbation parallel COVID-19 severity and activity // *J. Autoimmun.* 2021. V. 116. P. 102560. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102560>
- D'Ardes D., Boccatonda A., Cocco G. et al.* Impaired coagulation, liver dysfunction and COVID-19: discovering an intriguing relationship // *World J. Gastroenterol.* 2022. V. 28 (11). P. 1102–1112. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i11.1102>
- Di Gennaro C., Galdiero M., Scherillo G. et al.* Editorial COVID-19 and thrombosis 2023: new waves of SARS-CoV-2 infection, triage organization in emergency department and the association of VOCs/VOI with pulmonary embolism // *Viruses.* 2022. V. 14 (11). P. 2453. <https://doi.org/10.3390/v14112453>
- Diao B., Wang C.H., Wang R.S. et al.* Human kidney is a target for novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection // *medRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.04.20031120>
- Escher R., Breakey N., Lämmle B.* Severe COVID-19 infection associated with endothelial activation // *Thromb. Res.* 2020. V. 190. P. 62. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.014>
- Falcinelli E., Petito E., Greslele P.* The role of platelets, neutrophils and endothelium in COVID-19 infection // *Expert Rev. Hematol.* 2022. V. 15 (8). P. 727–745. <https://doi.org/10.1080/17474086.2022.2110061>
- Fox S.E., Akmatbekov A., Harbert J.L. et al.* Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans // *Lancet Respir. Med.* 2020. V. 8 (7). P. 681–686. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30243-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30243-5)
- Frithiof R., Rostami E., Kumlien E. et al.* Critical illness polyneuropathy, myopathy and neuronal biomarkers in COVID-19 patients: a prospective study // *Clin. Neurophysiol.* 2021. V. 132 (7). P. 1733–1740. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2021.03.016>
- Fujimura Y., Holland L.Z.* COVID-19 microthrombosis: unusually large vWF multimers are a platform for activation of the alternative complement pathway under cytokine storm // *Int. J. Hematol.* 2022. V. 115 (4). P. 457–469. <https://doi.org/10.1007/s12185-022-03324-w>
- Gao Y., Wang C., Kang K. et al.* Cytokine storm may not be the chief culprit for the deterioration of COVID-19 // *Viral. Immunol.* 2021. V. 34 (5). P. 336–341. <https://doi.org/10.1089/vim.2020.0243>
- Gauchel N., Rieder M., Krauel K. et al.* Complement system component dysregulation is a distinctive feature of COVID-19 disease // *J. Thromb. Thrombolysis.* 2022. V. 53 (4). P. 788–797. <https://doi.org/10.1007/s11239-021-02617-x>
- Ghasemzadeh M., Ahmadi J., Hosseini E.* Platelet-leukocyte crosstalk in COVID-19: how might the reciprocal links between thrombotic events and inflammatory state affect treatment strategies and disease prognosis? // *Thromb. Res.* 2022. V. 213. P. 179–194. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2022.03.022>
- Gorog D.A., Storey R.F., Gurbel P.A. et al.* Current and novel biomarkers of thrombotic risk in COVID-19: a Consensus Statement from the International COVID-19 Thrombosis Biomarkers Colloquium // *Nat. Rev. Cardiol.* 2022. V. 19 (7). P. 475–495. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00665-7>
- Grobbelaar L.M., Venter C., Vlok M. et al.* SARS-CoV-2 spike protein S1 induces fibrin(ogen) resistant to fibrinolysis: implications for microclot formation in COVID-19 // *Biosci. Rep.* 2021. V. 41 (8). P. BSR20210611. <https://doi.org/10.1042/BSR20210611>
- Grobler C., Maphumulo S.C., Grobbelaar L.M. et al.* Covid-19: the rollercoaster of fibrin(ogen), D-dimer, von Willebrand factor, P-selectin and their interactions with endothelial cells, platelets and erythrocytes // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21 (14). P. 5168. <https://doi.org/10.3390/ijms21145168>
- Gu S.X., Tyagi T., Jain K. et al.* Thrombocytopeny and endotheliopathy: crucial contributors to COVID-19 thromboinflammation // *Nat. Rev. Cardiol.* 2021. V. 18 (3). P. 194–209. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-00469-1>
- Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y. et al.* Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382 (18). P. 1708–1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>
- Han H., Yang L., Liu R. et al.* Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2020. V. 58 (7). P. 1116–1120.
- Harrison C.* Focus shifts to antibody cocktails for COVID-19 cytokine storm // *Nat. Biotechnol.* 2020. V. 38 (8). P. 905–908.
- Hoffmann M., Kleine-Weber H., Pöhlmann S.* A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells // *Mol. Cell.* 2020. V. 78. P. 779–784. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>

- Hottz E.D., Azevedo-Quintanilha I.G., Palhinha L. et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19 // *Blood*. 2020. V. 136 (11). P. 1330–1341. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007252>
- Iba T., Wada H., Levy J.H. Platelet activation and thrombosis in COVID-19 // *Semin. Thromb. Hemost.* 2023. V. 49 (1). P. 55–61. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1749441>
- Jackson C.B., Farzan M., Chen B., Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022. V. 23 (1). P. 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Jenny L., Dobó J., Gál P., Schroeder V. MASP-1 induced clotting – the first model of prothrombin activation by MASP-1 // *PLoS One*. 2015. V. 10 (12). P. e0144633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144633>
- Jenny L., Noser D., Larsen J.B. et al. MASP-1 of the complement system alters fibrinolytic behaviour of blood clots // *Mol. Immunol.* 2019. V. 114. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.07.005>
- Jiang S.Q., Huang Q.F., Xie W.M. et al. The association between severe COVID-19 and low platelet count: evidence from 31 observational studies involving 7613 participants // *Br. J. Haematol.* 2020. V. 190 (1). P. e29–e33. <https://doi.org/10.1111/bjh.16817>
- Kakodkar P., Kaka N., Baig M.N. A comprehensive literature review on the clinical presentation, and management of the pandemic coronavirus disease 2019 (COVID-19) // *Cureus*. 2020. V. 12 (4). P. e7560. <https://doi.org/10.7759/cureus.7560>
- Kaur S., Singh A., Kaur J. et al. Upregulation of cytokine signalling in platelets increases risk of thrombophilia in severe COVID-19 patients // *Blood Cells Mol. Dis.* 2022. V. 94. P. 102653. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2022.102653>
- Kerch G. Severe COVID-19 A review of suggested mechanisms based on the role of extracellular matrix stiffness // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24 (2). P. 1187. <https://doi.org/10.3390/ijms24021187>
- Koupenova M. Potential role of platelets in COVID-19: implications for thrombosis // *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2020. V. 4 (5). P. 737–740. <https://doi.org/10.1002/rth2.12397>
- Kozarcenin H., Lood C., Munthe-Fog L. et al. The lectin complement pathway serine proteases (MASPs) represent a possible crossroad between the coagulation and complement systems in thromboinflammation // *J. Thromb. Haemost.* 2016. V. 14 (3). P. 531–545. <https://doi.org/10.1111/jth.13208>
- Krurup A., Wallis R., Presanis J.S. et al. Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2 // *PLoS One*. 2007. V. 2 (7). P. e623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000623>
- Kuhn C.C., Basnet N., Bodakuntla S. et al. Direct Cryo-ET observation of platelet deformation induced by SARS-CoV-2 spike protein // *bioRxiv*. Preprint. 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.11.22.517574>
- Lee M.H., Perl D.P., Steiner J. et al. Neurovascular injury with complement activation and inflammation in COVID-19 // *Brain*. 2022. V. 145 (7). P. 2555–2568. <https://doi.org/10.1093/brain/awac151>
- Levi M., Thachil J., Iba T., Levy J.H. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19 // *Lancet Haematol.* 2020. V. 7 (6). P. e438–e440. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30145-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30145-9)
- Li T., Yang Y., Li Y. et al. Platelets mediate inflammatory monocyte activation by SARS-CoV-2 spike protein // *J. Clin. Invest.* 2022. V. 132 (4). P. e150101. <https://doi.org/10.1172/JCI150101>
- Liang Y., Fang D., Gao X. et al. Circulating microRNAs as emerging regulators of COVID-19 // *Theranostics*. 2023. V. 13 (1). P. 125–147. <https://doi.org/10.7150/thno.78164>
- Liao M., Liu Y., Yuan J. et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19 // *Nat. Med.* 2020. V. 26 (6). P. 842–844. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0901>
- Lippi G., Favaloro E.J. What we know (and do not know) regarding the pathogenesis of pulmonary thrombosis in COVID-19 // *Semin. Thromb. Hemost.* 2023. V. 49 (1). P. 27–33. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1742091>
- Liu Y., Sun W., Guo Y. et al. Association between platelet parameters and mortality in coronavirus disease 2019: retrospective cohort study // *Platelets*. 2020. V. 31 (4). P. 490–496. <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1754383>
- Ma L., Sahu S.K., Cano M. et al. Increased complement activation is a distinctive feature of severe SARS-CoV-2 infection // *Sci. Immunol.* 2021. V. 6. P. eabh2259. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abh2259>
- Magro C., Mulvey J.J., Berlin D. et al. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: a report of five cases // *Transl. Res.* 2020. V. 220. P. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.007>
- McFadyen J.D., Stevens H., Peter K. The emerging threat of (micro)thrombosis in COVID-19 and its therapeutic implications // *Circ. Res.* 2020. V. 127 (4). P. 571–587. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317447>
- Merad M., Martin J.C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages // *Nat. Rev. Immunol.* 2020. V. 20 (6). P. 355–362. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>
- Middleton E.A., He X.Y., Denorme F. et al. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome // *Blood*. 2020. V. 136. P. 1169–1179. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007008>
- Mizurini D.M., Hottz E.D., Bozza P.T., Monteiro R.Q. Fundamentals in COVID-19-associated thrombosis: molecular and cellular aspects // *Front. Cardiovasc. Med.* 2021. V. 8. P. 785738. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.785738>
- Moraes E.C.D.S., Martins-Gonçalves R., Da Silva L.R. et al. Proteomic profile of procoagulant extracellular vesicles reflects complement system activation and platelet hyperreactivity of patients with severe COVID-19 // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022. V. 12. P. 926352. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926352>
- Morris G., Bortolasci C.C., Puri B.K. et al. The pathophysiology of SARS-CoV-2: a suggested model and therapeutic approach // *Life Sci.* 2020. V. 258. P. 118166. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118166>
- Mukund K., Mathee K., Subramaniam S. Plasmin cascade mediates thrombotic events in SARS-CoV-2 infection via complement and platelet-activating systems // *IEEE Open J. Eng. Med. Biol.* 2020. V. 1. P. 220–227. <https://doi.org/10.1109/OJEMB.2020.3014798>
- Nahum J., Morichau-Beauchant T., Daviaud F. et al. Venous thrombosis among critically ill patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) // *JAMA Netw. Open*.

2020. V. 3 (5). P. e2010478.  
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.10478>
- Panigada M., Bottino N., Tagliabue P. et al.* Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: a report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis // *J. Thromb. Haemost.* 2020. V. 18 (7). P. 1738–1742.  
<https://doi.org/10.1111/jth.14850>
- Parums D.V.* Editorial: the XBB.1.5. (“Kraken”) subvariant of Omicron SARS-CoV-2 and its rapid global spread // *Med. Sci. Monit.* 2023. V. 29. P. e939580.  
<https://doi.org/10.12659/MSM.939580>
- Passariello M., Vetrei C., Amato F., De Lorenzo C.* Interactions of spike-RBD of SARS-CoV-2 and platelet factor 4: new insights in the etiopathogenesis of thrombosis // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22 (16). P. 8562.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22168562>
- Perico L., Morigi M., Galbusera M. et al.* SARS-CoV-2 spike protein 1 activates microvascular endothelial cells and complement system leading to platelet aggregation // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. P. 827146.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.827146>
- Poor H.D.* Pulmonary thrombosis and thromboembolism in COVID-19 // *Chest.* 2021. V. 160 (4). P. 1471–1480.  
<https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.06.016>
- Qi F., Qian S., Zhang S., Zhang Z.* Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 526 (1). P. 135–140.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.044>
- Rohlfing A.K., Rath D., Geisler T., Gawaz M.* Platelets and COVID-19 // *Hamostaseologie.* 2021. V. 41 (5). P. 379–385.  
<https://doi.org/10.1055/a-1581-4355>
- Santos A.P., Couto C.F., Pereira S.S., Monteiro M.P.* Is serotonin the missing link between COVID-19 course of severity in patients with diabetes and obesity? // *Neuroendocrinology.* 2022. V. 112. P. 1039–1045.  
<https://doi.org/10.1159/000522115>
- Sastry S., Cuomo F., Muthusamy J.* COVID-19 and thrombosis: the role of hemodynamics // *Thromb. Res.* 2022. V. 212. P. 51–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2022.02.016>
- Sheth A.R., Grewal U.S., Patel H.P. et al.* Possible mechanisms responsible for acute coronary events in COVID-19 // *Med. Hypotheses.* 2020. V. 143. P. 110125.  
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110125>
- Sonmez O., Sonmez M.* Role of platelets in immune system and inflammation // *Porto Biomed. J.* 2017. V. 2 (6). P. 311–314.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbj.2017.05.005>
- Stark K.* Platelet-neutrophil crosstalk and netosis // *HemaSphere.* 2019. V. 3. P. 89–91.  
<https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000231>
- Suh Y.J., Hong H., Ohana M. et al.* Pulmonary embolism and deep vein thrombosis in COVID-19: a systematic review and meta-analysis // *Radiology.* 2021. V. 298. P. E70–E80.  
<https://doi.org/10.1148/radiol.2020203557>
- Tang N., Li D., Wang X., Sun Z.* Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia // *J. Thromb. Haemost.* 2020. V. 18. P. 844–847.  
<https://doi.org/10.1111/jth.14768>
- Taus F., Salvagno G., Canè S. et al.* Platelets promote thromboinflammation in SARS-CoV-2 pneumonia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2020. V. 40 (12). P. 2975–2989.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315175>
- Thachil J., Tang N., Gando S. et al.* ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19 // *J. Thromb. Haemost.* 2020. V. 18 (5). P. 1023–1026.  
<https://doi.org/10.1111/JTH.14860>
- Thillai M., Patvardhan C., Swietlik E.M. et al.* Functional respiratory imaging identifies redistribution of pulmonary blood flow in patients with COVID-19 // *Thorax.* 2021. V. 76 (2). P. 182–184.  
<https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-215395>
- Thomas W., Varley J., Johnston A. et al.* Thrombotic complications of patients admitted to intensive care with COVID-19 at a teaching hospital in the United Kingdom // *Thromb. Res.* 2020. V. 191. P. 76–77.  
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.028>
- Tiwari R., Mishra A.R., Mikaeloff F. et al.* *In silico* and *in vitro* studies reveal complement system drives coagulation cascade in SARS-CoV-2 pathogenesis // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 3734–3744.  
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.005>
- Ulanowska M., Olas B.* Modulation of hemostasis in COVID-19; blood platelets may be important pieces in the COVID-19 puzzle // *Pathogens.* 2021. V. 10 (3). P. 370.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens10030370>
- Vadasz Z., Brenner B., Toubi E.* Immune-mediated coagulopathy in COVID-19 infection // *Semin. Thromb. Hemost.* 2020. V. 46 (7). P. 838–840.  
<https://doi.org/10.1055/s-0040-1714272>
- Varatharajah N., Rajah S.* Microthrombotic complications of COVID-19 are likely due to embolism of circulating endothelial derived ultralarge von Willebrand factor (eULvWF) decorated-platelet strings // *Fed. Pract.* 2020. V. 37 (6). P. 258–259.
- Violi F., Pignatelli P., Cammisotto V. et al.* COVID-19 and thrombosis: clinical features, mechanism of disease, and therapeutic implications // *Kardiol. Pol.* 2021. V. 79 (11). P. 1197–1205.  
<https://doi.org/10.33963/KP.a2021.154>
- Wang J., Doran J.* The many faces of cytokine release syndrome-related coagulopathy // *Clin. Hematol. Int.* 2021. V. 3 (1). P. 3–12.  
<https://doi.org/10.2991/chi.k.210117.001>
- Wienkamp A.K., Erpenbeck L., Rossaint J.* Platelets in the NETWORKS interweaving inflammation and thrombosis // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. P. 953129.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.953129>
- Wool G.D., Miller J.L.* The impact of COVID-19 disease on platelets and coagulation // *Pathobiology.* 2021. V. 88 (1). P. 15–27.  
<https://doi.org/10.1159/000512007>
- Xiang M., Wu X., Jing H. et al.* The impact of platelets on pulmonary microcirculation throughout COVID-19 and its persistent activating factors // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. P. 955654.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.955654>
- Xiao T., Lu J., Zhang J. et al.* A trimeric human angiotensin-converting enzyme 2 as an anti-SARS-CoV-2 agent // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021. V. 28. P. 202–209.  
<https://doi.org/10.1038/s41594-020-00549-3>
- Yang X., Yang Q., Wang Y. et al.* Thrombocytopenia and its association with mortality in patients with COVID-19 // *J. Thromb. Haemost.* 2020. V. 18. P. 1469–1472.  
<https://doi.org/10.1111/jth.14848>
- Ye Q., Wang B., Mao J.* The pathogenesis and treatment of the “cytokine storm” in COVID-19 // *J. Infect.* 2020.

- V. 80. P. 607–613.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.037>
- Yu J., Yuan X., Chen H. *et al.* Direct activation of the alternative complement pathway by SARS-CoV-2 spike proteins is blocked by factor D inhibition // *Blood*. 2020. V. 136 (18). P. 2080–2089.  
<https://doi.org/10.1182/blood.2020008248>
- Zhang S., Liu Y., Wang X. *et al.* SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19 // *J. Hematol. Oncol.* 2020. V. 13 (1). P. 120.  
<https://doi.org/10.1186/s13045-020-00954-7>
- Zhang Y., Zeng X., Jiao Y. *et al.* Mechanisms involved in the development of thrombocytopenia in patients with COVID-19 // *Thromb. Res.* 2020. V. 193. P. 110–115.
- Zhou F., Yu T., Du R. *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study // *Lancet*. 2020. V. 395. P. 1054–1062.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
- Zhu A., Real F., Capron C. *et al.* Infection of lung megakaryocytes and platelets by SARS-CoV-2 anticipate fatal COVID-19 // *Cell. Mol. Life Sci.* 2022. V. 79 (7). P. 365.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-022-04318-x>
- Zuo Y., Yalavarthi S., Shi H. *et al.* Neutrophil extracellular traps in COVID-19 // *JCI Insight*. 2020. V. 5 (11). P. e138999.  
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.138999>

## Platelet Activation and Mechanisms of Thromboembolism Formation in Patients with Severe COVID-19. Alternative Mechanisms of Hemostasis System Activity

**B. I. Kuznik<sup>a</sup>, Y. N. Smolyakov<sup>a</sup>, \*, N. N. Tsybikov<sup>a</sup>, and K. G. Shapovalov<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Chita State Medical Academy, Chita, Russia*

\**e-mail: smolyakov@rambler.ru*

The review highlights the mechanism of development of hypercoagulation and thrombosis in severe forms of COVID-19. The introduction of the SARS-CoV-2 virus into the host organism is carried out by the interaction of the spike protein S with the angiotensin-converting enzyme ACE-2, which is located in type 2 alveocytes, vascular endothelium, kidneys, liver and other organs. In the event of a serious condition in patients with COVID-19, both nonspecific and adaptive immunity are activated. Stimulation of the complement system with the appearance of C3a, C3b, C5a fragments and the membrane attack complex (MAC) creates conditions for the development of hypercoagulability. The involvement of the renin-angiotensin-aldosterone system in this process and the appearance of angiotensin 2 (Ang-2) further increase the intensity of hypercoagulability. When the SARS-CoV-2 virus enters cells, the protective reaction of the adaptive immune system can turn into a pathological one (a cytokine storm develops), characterized by a high level of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-17, etc.) and chemokines (CCL-2, CCL-11, etc.), which ultimately leads to the development of thromboangiopathy or otherwise immunothrombosis in seriously ill patients with COVID-19. Patients with more severe lesions may develop a condition similar to DIC. At the same time, patients with COVID-19 have mild thrombocytopenia, elevated levels of fibrinogen, D-dimer, fibrinogen degradation products (FDP), which indicates intense thrombus formation, as well as short PT and APTT, due to a largely increased level of FVIII. In COVID-19, along with the classical one, an alternative pathway (bypassing thrombin) of regulation of the hemostasis system and thrombus formation appears, mainly associated with the influence of the spike protein S (PS, PROS1) of the SARS-CoV-2 virus and papain-like protease (PROS1). Protein S directly affects the conversion of fibrinogen to fibrin, as well as the activation of individual plasma coagulation factors. The alternative pathway of blood coagulation is also due to the activation of the complement system *via* the lectin pathway with the inclusion of metalloproteinases MASP-1, 2 and 3. In addition, the S protein activates tPA, which may be accompanied by hyperfibrinolysis. In seriously ill patients with COVID-19, platelets play an important role in the occurrence of thromboembolic complications. During the release reaction, platelets are released from the cytoplasm into the blood  $\alpha$  and dense granules containing inflammatory cytokines and chemokines, which enhances the cytokine storm and, consequently, thrombus formation. By acting on the spike protein S, platelets enhance an alternative way of regulating the hemostasis system and thrombus formation.

**Keywords:** COVID-19, platelets, spike protein S, complement system, cytokine storm, neutrophils, monocytes, hypercoagulation, thrombosis, alternative mechanisms

УДК 615.91:636.084.4

## ТОКСИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА И ИХ ИСТОЧНИКИ В КОРМАХ ДЛЯ ПУШНЫХ ЗВЕРЕЙ

© 2023 г. С. В. Бекетов<sup>1</sup>, \*, И. В. Богомолова<sup>2</sup>, М. Н. Прадед<sup>3</sup>,  
И. В. Топорова<sup>2</sup>, Л. В. Топорова<sup>2</sup>, А. П. Каледин<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Московская государственная академия ветеринарной медицины  
и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина, Москва, Россия

<sup>3</sup>Международный центр медицинской пиявки, Удельная, Московская обл., Россия

<sup>4</sup>Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

\*e-mail: svbeketov@gmail.com

Поступила в редакцию 28.02.2023 г.

После доработки 01.03.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Использование в пушном звероводстве большого разнообразия животных и растительных кормов, значительное количество поставщиков, а также сложность перевозки и хранения кормового сырья увеличивают риски возникновения кормовых токсикоинфекций и токсикозов. В предлагаемой обзорной статье подробно рассмотрены основные токсические вещества и их источники в кормах для пушных зверей, включая токсины биологической и химической природы: бактериальные и грибковые метаболиты, продукты распада белка и окисления жира, биотоксины рыб, тяжелые металлы, стойкие хлорорганические соединения, пестициды и др.

*Ключевые слова:* пушное звероводство, кормовые токсины, токсикоинфекции, токсикозы

DOI: 10.31857/S0042132423040038, EDN: RWPVGA

### ВВЕДЕНИЕ

Звероводство – сравнительно молодая отрасль животноводства, насчитывающая немногим более 100 лет, которая ориентирована на получение в промышленных масштабах шкурок ценных пушных зверей, среди которых преобладают хищные виды: американские норки, соболи, хорьки, песцы, лисицы и енотовидные собаки.

При этом эффективность звероводства находится в прямой зависимости от кормления, правильная организация которого с учетом биологических особенностей пушных зверей (анатомическое строение ЖКТ, физиологический период, сезонность жизненных функций и др.) способна обеспечить наиболее полное проявление продуктивных качеств животных и развитие их в желательном направлении.

Длительное неполноценное кормление приводит к общему недоразвитию молодняка, снижает показатели продуктивности и воспроизводства у взрослых животных. При этом значение имеют не только общая питательность и структура рационов, но и санитарно-химическое качество корма. Однако проблема качества кормов характерна се-

годня не только для пушного звероводства, но и для всего животноводства в целом.

Так, мониторинг образцов различных партий отечественных и импортных кормовых средств показывает, что в 15% исследуемых кормов растительного и 25% кормов животного происхождения в 10–100 раз превышены допустимые нормы по показателю общего микробного числа в кормах для сельскохозяйственных животных и птицы (Гранкина, Голякевич, 2016). В свою очередь, анализ кормового сырья для пушных зверей на микотоксины выявил наличие фумонизинов в 22.6% образцов корма, дезоксиниваленола – в 16.1% и зеараленона – в 19.4%, причем в некоторых случаях готовая кормосмесь содержала более одного токсического грибкового метаболита (Lyhs et al., 2019).

Фактически все сельскохозяйственные предприятия в той или иной степени сталкиваются с загрязнением кормов вредными веществами (токсинами), что порой приводит к существенным экономическим потерям.

### ТОКСИНЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ

В звероводстве в основном используют корма животного происхождения (цельная непищевая

рыба, сухие концентрированные корма, рыбные и мясные отходы) и лишь в незначительной степени растительные корма зерновой и овощной групп.

При этом как животные, так и растительные корма при определенных условиях могут становиться источниками различных токсикоинфекций и токсикозов.

### Бактериальные токсины

Кормовые токсикоинфекции характеризуются острыми и массовыми заболеваниями, которые возникают при употреблении зверями кормов с повышенной обсемененностью живыми условно-патогенными и патогенными бактериями и токсическими веществами, выделяемыми при их размножении и гибели.

Возбудителями токсикоинфекций являются представители семейств: Enterobacteriaceae – *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*; Vibrionaceae – *V. parahaemolyticus*; Bacillaceae – *Bac. cereus*, *Cl. perfringens*; Streptococcaceae – *S. faecalis*; Pseudomonadaceae – *P. aeruginosa*. Кроме того, достаточно часто по типу кормовых токсикоинфекций протекают заболевания, вызываемые эшерихиями, сальмонеллами, шигеллами и иерсиниями (Госманов и др., 2010). Микроорганизмы – возбудители токсикоинфекций – продуцируют как эндо-, так и экзотоксины. По химической структуре: эндотоксины – липополисахариды, оказывающие энтеротропное и нейротропное действие, а экзотоксины – белки, обладающие энтеротоксическими и цитотоксическими свойствами. Под воздействием энтеротоксина усиливается секреция жидкости и солей в просвет кишечника, развивается диарея, с чем связано нарушение водно-солевого обмена в организме животных. Цитотоксическое воздействие экзотоксинов заключается в повреждении клеток эпителия слизистой оболочки пищеварительного тракта, в которой происходят воспалительные изменения (Повреждающее действие..., 1999; Таболин и др., 2003).

В отличие от токсикоинфекций, бактериальные токсикозы возникают при употреблении зверями корма, содержащего энтерально действующий экзотоксин, накопившийся в результате развития специфического возбудителя, который может либо полностью отсутствовать в корме, либо обнаруживаться лишь в небольшом количестве. В качестве примера можно привести ботулизм и стафилококковые токсикозы.

Возможны и токсические реакции смешанной этиологии, обусловленные совместным действием двух возбудителей токсикоинфекций (например, *Bac. cereus* и *E. coli*) или токсикоинфекции и токсикоза (*Bac. cereus* и токсин стафилококка и др.).

Использование в звероводстве скоропортящихся высокобелковых кормов животного происхож-

дения увеличивает риски микробных загрязнений. Как исходное кормовое сырье, так и готовая кормосмесь для пушных зверей могут содержать токсигенные бактерии, которые вызывают массовые заболевания. Особенно эта проблема актуальна для европейских зверохозяйств, где в отличие от российских, имеющих собственные кормоцеха, одна крупная кормокухня обслуживает сразу несколько десятков ферм. В специальной литературе описаны случаи, когда зараженный *Salmonella* spp. или *Clostridium limosum* корм для пушных зверей становился причиной массовых аборт и падежа зверей в Северной Европе (Hunter et al., 1983; Dietz et al., 2006; Biström et al., 2016).

Так, в 2000 г. на фермах Дании зарегистрирована вспышка некротического метрита с массовой гибелью самок норок. Установлено, что причиной токсикоинфекции являлась *Salmonella dublin* (Dietz et al., 2006). Через несколько лет, в 2003 г. сходные симптомы, сопровождавшиеся тяжелыми метритами и гибелью животных, отмечали у норок на фермах Финляндии. В этом случае выявленным источником токсикоинфекции была бактерия *Clostridium limosum* (Biström et al., 2016).

Ранее сообщалось, что аборты у норок вызывает *Campylobacter jejuni* (Hunter et al., 1983). После чего специально изучали встречаемость кампилобактерий в фекалиях норок на 9 фермах северо-западной части Финляндии и в кормах, поступавших в эти хозяйства из двух центральных кормокухонь. По результатам анализов все пробы кала и кормов за исключением одной из ферм оказались отрицательными на присутствие кампилобактерий *C. jejuni* и *C. coli* (Hänninen et al., 1988).

Еще больший экономический ущерб в звероводстве связан со вспышками ботулизма. Чаще всего ботулинический токсин образуется при неправильном хранении мясных субпродуктов, которые используются при производстве кормов. Наиболее восприимчивы к ботулотоксину хорьки и норки, в меньшей степени – песцы и особенно лисицы. Например, пероральная токсичность ботулинического токсина типа С для лисиц варьирует от 103 до более чем 108 минимальных смертельных доз для белых мышей.

Одна из крупнейших зарегистрированных вспышек ботулизма типа С произошла в Финляндии в 2004 г. Тогда эпидемиологическое обследование 117 (74.5%) из 157 хозяйств подтвердило гибель 44130 животных, 8033 заболевших зверя с более легкими симптомами отравления выздоровели. Общая смертность по хозяйствам составила 21.7%. Падеж у вылевых песцов и песцов тень оказался на уровне 24.2 и 27.8% соответственно, у серебристо-черных лисиц и норок – менее 4%. Несмотря на высокую чувствительность, низкая смертность норок была связана с тем, что в возрасте 2 мес. они были иммунизированы против бо-

тулинического токсина типа С. Основную причину возникшего токсикоза связывали с некачественным кормом, поставляемым единым поставщиком, обслуживающим в том числе 83 зверофермы из завявших о падеже зверей (Lindström et al., 2004).

В 2017 г. в Дании, до недавнего времени одной из ведущих в мире стран-производителей норковых шкурок, исследование 108 готовых кормов для норок впервые показало в 20 из них присутствие метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Hansen et al., 2017). Предполагается, что его источником могли быть сырые побочные продукты убоя свиней (Hansen, 2018).

Позднее у норок, кроме MRSA, стали обнаруживать устойчивые к антибиотикам бактерии *E. coli*. И это несмотря на то, что за период с 2017 по 2018 гг. общее потребление антибиотиков в звероводстве Дании снизилось на 50% (Nikolaisen et al., 2022), а применение любых кормовых форм антибиотиков в качестве стимуляторов роста запрещено еще с 1998 г.

Всего же к 2018 г. использование антибиотиков на датских зверофермах составило 3700 кг, из которых 57% были представлены  $\beta$ -лактамами антибиотиками. В структуре животноводства страны в 2018 г. на долю звероводства приходилось до 4% общего потребления антибиотиков при суммарной биомассе норок в 2% (Høj et al., 2019). Мониторинг ферм в 2018–2019 гг. показал, что большинство используемых антибиотиков относятся к трем основным группам: пенициллинам, макролидам, тетрациклинам. В течение производственного года антибиотики краткосрочно применялись в период гона, в период отъема щенков от матерей и в период роста молодняка (Nikolaisen et al., 2022).

В частности, в Дании ни одна норковая ферма не обходилась без амоксициллина для элиминации так называемого синдрома залипания щенков. Эта болезнь приводит к гибели молодняка норок в возрасте 1–4 нед. и характеризуется водянистой диареей и чрезмерной секрецией апокринных потовых желез с выраженным темным экссудатом, покрывающим шкурку (Vahl et al., 2020). Предполагается, что патогенез является многофакторным, может инициироваться энтеропатогенными вирусными агентами (астро- и калицивирусами) и осложняться вторичными бактериальными инфекциями, вызывающими дисбактериоз (Mittelholzer et al., 2003).

### Грибковые токсины

Кроме бактериальной обсемененности, используемые в звероводстве растительные корма (зерно, кукурузный глютен, соевый шрот, горох, овощи, фрукты и др.) могут быть поражены грибной микрофлорой и служить источником микотоксинов. Токсичные метаболиты плесневых грибов —

сильные канцерогены и мутагены, обладающие иммунодепрессивным и психотропным действием, при поступлении с кормом в пищеварительный тракт они проникают в кровеносную систему и разносятся по всему организму.

И хотя, в отличие от кормов животного происхождения, растительные корма в структуре рационов пушных зверей составляют незначительную долю, тем не менее известны случаи отравления микотоксинами (Тремасов, 2002). Чувствительность к микотоксинам зависит от их концентрации, вида животного, возраста и пола.

Из пушных зверей наиболее восприимчивы к воздействию грибковых токсинов американские норки. Микотоксикозы у норок сопровождаются диареей, снижением аппетита, ухудшением воспроизводительной функции самок, уменьшением выхода потомства, массовой гибелью молодняка и взрослых особей. У зверей повышается восприимчивость к инфекционным и незаразным заболеваниям, снижается эффективность вакцинации. Изменяется качество шкурки: шерстный покров становится тусклым, взъерошенным, появляются аллопеции (Самсонов, 2008).

При нынешнем ассортименте растительных кормов в звероводстве наиболее распространены токсикозы, вызываемые преимущественно микроскопическими плесневыми грибами (микроспоритами) рода *Fusarium* (Монастырский, Першакова, 2009), которые вырабатывают токсины, относящиеся к классу трихотеценов, фумонизинов, а также монилиформин и зеараленон.

Трихотеценовые микотоксины — вторичные метаболиты микроскопических плесневых грибов (микроспоритов) рода *Fusarium* и в меньшей степени родов *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Trichothecium* и *Mizothecium* — сильные иммунодепрессанты, поражающие органы кровотока, ЖКТ, повышающие риск возникновения внутренних геморрагий (Wannemacher et al., 1991). Токсины фузариоза обнаруживали в кукурузной глютенной муке, экструдированном ячмене и пшенице, используемых для кормления пушных зверей (Lyhs et al., 2019).

К наиболее опасным болезням, вызываемым фузариотоксинами, относят споротрихиеллотоксикоз и фузариотоксикоз. При споротрихиеллотоксикозе продуцентом трихотеценового контаминанта — токсина Т-2 — является *Fusarium sporotrichioides*. Отравление характеризуется поражением костного мозга и снижением иммунитета. Фузариотоксикоз развивается под действием дезоксиэриваленола при скармливании животным зерна, зараженного *Fusarium graminearum*, и сопровождается пищевыми и нервными расстройствами (Ахмадышин и др., 2007; Овсянкина, 2013). Чаще всего дезоксиэриваленол и другие трихотецены типа В

стимулируют у пушных зверей рвоту с отказом от корма (Wu et al., 2014).

Фумонизины – еще одна группа микотоксинов, выделяемых плесневыми грибами рода *Fusarium*, главным образом *Fusarium verticillioides* и *Fusarium proliferatum*. Особенно токсичен фумонизин В1 – наиболее распространенный токсин, который встречается в основном в кукурузе, пшенице и других злаках. У самцов норок, подвергшихся воздействию фумонизина В1, отмечали повышение концентрации сфинганина в моче (Bursian et al., 2004).

Микотоксин монилиформин впервые выделен в 1973 г. из культур изолята *Fusarium moniliforme*, который позже был идентифицирован как *F. proliferatum*. Список видов, продуцирующих монилиформин, включает *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. subglutinans* и *F. tricinctum* (Jestoi, 2008). У норок, потреблявших корм, загрязненный монилиформин, наблюдались характерные ультраструктурные изменения в сердце (Bursian et al., 2004).

Зеараленон образуется в фузариозной пшенице в период уборки вследствие увлажнения атмосферными осадками, которые способствуют вторичному сапрофитному росту фузариев (*Fusarium graminearum* и др.). Зеараленон обладает выраженной эстрогенной активностью и вызывает вульвовагиниты у самок норок, его минимальная токсическая доза отмечается на уровне – 1.5 мг/кг корма (Жуленко и др., 2004; Bursian et al., 2004).

Наряду с фузариозными токсинами, в качестве типичных представителей микотоксинов в зерне и зернопродуктах отмечают афлатоксины.

В настоящее время семейство афлатоксинов включает четыре основных представителя (афлатоксины В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) и еще более 10 соединений, являющихся производными или метаболитами основной группы (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, В<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub>, GM<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub> и др.).

По своей природе афлатоксины – это фурукумарины. Они обладают способностью сильно флюоресцировать при воздействии УФ-излучения, что лежит в основе практически всех физико-химических методов их обнаружения. Афлатоксины продуцируются главным образом микроскопическими грибами: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium expansum*, *P. urticae*, *P. cyclopium* и др. (Тутельян, Кравченко, 1985; Bennett, Klich, 2003). Отравление пушных зверей афлатоксинами ухудшает качество шкур, снижает потребление кормов, повреждает почки и печень животных (Vonna et al., 1991).

Афлатоксин В1, обладающий сильнейшим гепатотоксическим и гепатоканцерогенным действием, – наиболее токсичен для животных среди афлатоксинов (Meissonnier et al., 2008; Chen et al., 2010). Основные источники афлатоксина В1 – зараженные аспергиллами *Aspergillus flavus* и *A. par-*

*asiticus* продукты растительного происхождения: бобовые, зерновые и др.

Охратоксины – близкие по структуре к афлатоксинам соединения – обнаружены во многих продуктах растительного происхождения, в том числе в пшенице и ячмене. Из культуры гриба *A. ochraceus* выделено четыре охратоксина – А, В, С и D. Наибольшее санитарно-токсикологическое значение имеет охратоксин А, который, наряду с *Aspergillus ochraceus*, продуцируют *A. melleus*, *A. sulphureus*, *A. petrakii* и *Penicillium viridicatum* (Буркин и др., 2003; Жуленко и др., 2004).

Охратоксин А обладает выраженной кумуляцией, повышает уровни малондальдегида и гидроксипролина в печени и почках при одновременном снижении уровня глутатионпероксидазы, повреждает миокард и легкие. Присутствие охратоксина в кормах для пушных зверей приводит к существенному снижению живой массы животных и поражению почек (Bursian et al., 2004).

Продуцентами токсина патулина являются различные виды родов: *Penicillium* – *P. expansum*, *P. claviforme*, *P. urticae* (*P. patulum*), *P. cyclopium*, *P. viridicatum*, *P. roqueforti*; *Aspergillus* – *A. clavatus*, *A. terreus*, *A. giganteus*, а также *Byssoschlamys fulva* и *B. nivea*, поражающие преимущественно фрукты и некоторые овощи. Чаше, чем другие плоды, патулином загрязняются яблоки, содержание токсина в которых может достигать до 17.7 мг/кг. Содержание патулина в кормах не должно превышать максимально допустимый уровень 0.5 мг/кг (Тутельян, Кравченко, 1985; Трмасов, 2005).

Способность грибковых метаболитов подавлять иммунную систему приводит к более высокому риску бактериальных и вирусных инфекций и увеличению потребления антибиотиков. Поэтому необходимо предотвращать и контролировать не только бактериальное, но и плесневое загрязнение как в сырье, так и в готовых к употреблению кормах.

Различные виды дрожжей родов *Trichosporon*, *Hansenula*, *Zygozopora*, *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Torulopsis*, *Brettanomyces*, *Yarrowia* (Ugalde, Castriello, 2002; Obaeda, 2021) служат сырьем для получения кормовой белковой массы (паприн, гаприн, эприн, кормовые гидролизные дрожжи, дрожжи сульфитного производства, пивные и пекарские дрожжи и др.).

Дрожжевые микроорганизмы устойчивы к инфекциям, способны усваивать разнообразные источники углерода и азота и могут расти на простых средах. Дрожжи продуцируют биомассу с высокими питательными свойствами. Однако дрожжи могут содержать значительное количество небелковых соединений азота. Прежде всего это нуклеиновые кислоты, которые присутствуют в относительно высоких концентрациях в быстро делящихся клетках дрожжей (до 10–12% сухого

вещества). Как следствие, при поедании дрожжевой белковой массы в организме животных образуется много нежелательных продуктов распада нуклеиновых кислот.

Попадая в организм, нуклеиновые кислоты под действием ферментов распадаются до пуриновых и пиримидиновых оснований. Дегградация пуриновых оснований приводит к образованию и накоплению мочево́й кислоты с отложением кристаллов мочеислого натрия в мягких тканях и суставах, а также конкрементов в мочевыделительной системе. В свою очередь пиримидины расщепляются до оротовой кислоты, накопление которой ведет к поражению печени (Ugalde, Castrillo, 2002).

Тем не менее, при выращивании отсаженного молодняка норок кормосмесь, в которой 23.5% псевариваемого протеина приходилось на долю эприна (сухая биомасса инактивированных дрожжей рода *Candida*), обеспечила нормальные показатели качества шкур, а замена в октябре–декабре в рационе серебристо-черных лисиц мясных кормов на 40–55% сульфитными кормовыми дрожжами улучшила их волосяной покров (Перельдик и др., 1987).

#### Биогенные амины

При неправильном хранении и транспортировке кормов животного происхождения (рыба, мясные и рыбные субпродукты), особенно в условиях высоких температур окружающей среды, под действием протеолитических ферментов микроорганизмов белковые молекулы расщепляются до полипептидов, три- и дипептидов, которые в свою очередь распадаются до аминокислот, с последующим образованием различных промежуточных и конечных продуктов: индол, скатол, фенол, нитраты, нитриты, крезол, меркаптаны, первичные, вторичные, третичные амины, аммиак, сероводород, летучие жирные кислоты, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O и др. (Берестов, Таранов, 1983).

Мировой океан – источник доступных и относительно дешевых кормов в звероводстве. Достаточно сказать, что в кормлении пушных зверей используется свыше 80 различных видов рыб. В настоящее время это, как правило, непищевая, некондиционная, мелкая, ломаная рыба, а также рыбные субпродукты: головы, хребты, плавники, хвосты, внутренности.

Соответственно, наибольшее количество токсикозов пушных зверей возникает при бактериальном разложении рыбы. Гистамин, тирамин и в меньшей степени фенилэтиламин дают несколько острых побочных реакций у животных. При этом основной биогенный амин, наиболее часто вызывающий интоксикации у пушных зверей, – гистамин. Он входит в состав так называемого скомброидного, или скумбриевого, токсина, пер-

воначально обнаруженного у рыб семейств Scomberesocidae и Scombridae. Кроме гистамина, скомброидный токсин включает ряд аминов (тирамин, фенилэтиламин, кадаверин, путресцин и др.), наличием которых и обусловлено возникновение симптомов токсикоза. Наиболее часто токсин образуется при порче сардины, тунца, скумбрии, атлантической пеламиды, желтохвоста, европейского саргана, большой корифены, макрели, анчоуса, луфары, сельди и австралийского лосося (Baylis, 2006).

Гистамин способен накапливаться в рыбных продуктах в результате декарбоксилирования аминокислоты гистидина под действием ферментов микрофлоры, развивающейся при температуре выше +15°C (Подсосонная, Родина, 2004; Halasz et al., 1994; Prester et al., 2009). В частности, повышенная активность фермента гистидиндекарбоксилазы обнаружена у штаммов бактерий *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella ornithinolytica*, а также *Raoultella planticola* и *Citrobacter youngae* (Kanki et al., 2002; Wauters et al., 2004). В дополнение к гистидину, представители Enterobacteriaceae spp. могут декарбоксилировать ряд других аминокислот, например, тирозин и лизин до тирамина и кадаверина, аргинин и орнитин до путресцина (Baylis, 2006).

При участии бактерий *Vibrio* spp. и *Photobacterium* spp. гистамин может образовываться и при более низких температурах (от 0 до +5°C), но в гораздо меньших количествах (Ben-Gigirey et al., 1998).

Как уже отмечалось выше, степень накопления гистамина зависит от уровня аминокислоты гистидина, массовая доля которой варьирует у рыб в зависимости от различных факторов. Например, увеличение уровня гистидина происходит с возрастом, по мере физиологического роста, но особенно его много у рыб с темной мускулатурой. В связи с чем выделяют высоко- и низкогистидиновые семейства и виды рыб. Следствием разницы уровней гистидина становится образование различного количества гистамина при порче таких рыб. Для сравнения: при одних и тех же условиях (+32°C в течение 24 ч) количество гистамина в тканях большой барракуды *Sphyaena barracuda* увеличивается до 30 мг/кг, а у большой корифены *Coryphaena hippurus* – до 2500 мг/кг.

Отравление гистамином – это аллергическая интоксикация. У животных гистамин вызывает расширение сосудов и последующую гипотензию, а также кожные, желудочно-кишечные (диарея, судороги и рвота) и неврологические расстройства, опосредованные специфическими гистаминовыми рецепторами клеточных мембран.

Высокие концентрации в корме для пушных зверей других биогенных аминов: агматина, кадаверина, β-фенилэтиламина, путресцина, спермина, спермидина, триптамина и тирамина – усиливают пероральную токсичность гистамина.

Продукты распада белка приводят к различным нарушениям физиологических функций животных, негативно влияют на воспроизводство пушных зверей, угнетают аппетит, повышают кровяное давление, вызывают дистрофию печени и гибель (Слугин, 2004).

Тем не менее, несмотря на важность проблемы, гистамин не контролируют в кормах для пушных зверей. В пищевой промышленности, согласно СанПиН 2.3.2.1078-01, предельно допустимая массовая доля гистамина составляет 100 мг/кг (Подсосонная, Родина, 2004). Согласно рекомендациям Американского управления по продовольствию и лекарствам, допустимая доза гистамина для высокогистидиновых рыб – 50 мг/кг, а Директива Совета Европейского Союза регулирует обязательный контроль уровня гистамина в рыбах, относящихся к семействам *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* и *Scomberesocidae* (Prester, 2011).

К серьезному отравлению приводит уровень гистамина в разложившейся рыбе >500 мг/кг (Hungerford, 2010).

С учетом небольшого количества гистамина в низкогистидиновых рыбных кормах предложено проводить оценку качества по путресцину и кадаверину. Для радужной форели *Oncorhynchus mykiss* приемлемым считается количество путресцина в 13–14 мг/кг (Chytiri et al., 2004; Rezaei et al., 2007), для другой пресноводной рыбы – карпа *Cyprinus carpio* – количество путресцина не должно превышать 10 мг/кг, а сумма путресцина и кадаверина – 20 мг/кг (Křížek et al., 2002).

### Окисленный жир

Наряду с продуктами распада белка, токсическими свойствами обладает окисленный жир. Окисляясь, животные жиры расщепляются на свободные жирные кислоты, образуя перекиси, а в последующем и альдегиды с заметным изменением органолептических свойств – появлением неприятного запаха, прогорклого вкуса и ржавого цвета.

Самоокисление жиров ускоряют температура, наличие кислорода, свет, особенно ультрафиолетовый, а также ионизирующие излучения. Активные катализаторы этого процесса – металлы переменной валентности: кобальт, медь, железо, марганец и никель (Лисицын и др., 2015).

Известно, что жир свиней и птицы окисляется быстрее, чем говяжий. Легкая окисляемость характерна и для рыбных жиров. Глубина окислительных процессов и скорость окисления находятся в прямой зависимости от количества входящих в жиры глицеридов полиненасыщенных жирных кислот и степени их ненасыщенности. Например, ненасыщенные и высоконенасыщенные жирные кислоты с 2–6 двойными связями.

При этом наличие кислот высокой непредельности у отдельных видов рыб достигает 85%, в связи с чем йодное число жира колеблется в диапазоне 120–200% (Перельдик и др., 1987).

Кормление беременных и лактирующих самок норок окисленным рыбным жиром приводит к падению концентрации  $\alpha$ -токоферола в плазме крови в конце лактационного периода, дегенерации тканей и анемии (Börsting et al., 2009). В то же время использование слабоокисленного рыбного жира при введении в рацион 14% ломаной жирной сельди (перекисное число до 1.71% J<sub>2</sub>) не представляет опасности для самок даже в репродуктивный период и не сказывается негативно на результатах размножения (Damgaard et al., 2003).

Из рыб, используемых в кормлении пушных зверей, весьма нестойка сайка. При температуре –18°C и ниже ее можно хранить не более 3 мес., затем жир начинает прогоркать, изменяется состав мышечной ткани, и рыба становится небезопасной для зверей.

Другой пример – скумбрия и ставрида, у которых вскоре после заморозки появляется подкожная желтизна, которая интенсивно развивается в процессе хранения. Однако подобное поверхностное пожелтение мороженой рыбы не всегда вызывается только окислительной порчей жира и может возникать от жирорастворимых каротиноидных пигментов, которые накапливаются в дерме, особенно в спинной части рыбы. Соответственно, характер образующегося пожелтения должен устанавливаться с учетом комплекса объективных показателей (Перельдик и др., 1987).

Однако даже качественный рыбный жир не может рассматриваться в качестве единственного источника жиров для кормления самок норок в период размножения (Börsting et al., 2009).

Так, в исследовании на взрослых самках норок, начиная с зимнего периода и до отсадки щенков, одной из экспериментальных групп в состав рациона включали 27% лома жирной и 10% обезжиренной сельди, для самок второй группы 19%-ная добавка рыбных кормов состояла из обезжиренного лома сельди. В повторном эксперименте в рацион самок норок вводили 20% лома жирной и 20% обезжиренной сельди для первой и второй групп соответственно. Установлено, что повышенный уровень рыбного жира в кормах для самок норок в период лактации приводил к снижению живой массы у щенков (Clausen et al., 1999). Дальнейшие эксперименты показали, что количество потребляемого с кормом рыбного жира в высокой дозировке (58% от обменной энергии корма) не влияло на самок, но приводило к мертворождениям в потомстве у самок и вызывало диарею и высокую смертность у подсосных щенков (Börsting et al., 2009). Ситуация осложняется тем, что содержание жира в рыбе очень вари-

абельно. Так, если уровень сырого протеина в филе рыб разных видов изменяется в пределах 6–28%, то сырой жир имеет более широкий диапазон колебания – 0.1–67% (Murray, Burt, 2001). В свою очередь неправильное нормирование рыбы с высоким содержанием жира при его избытке в рационе может привести к развитию гепатозов у пушных зверей и снижению их продуктивности.

### Биотоксины рыб

Некоторые виды рыб могут содержать токсические вещества и приводить к гибели пушных зверей при скармливании. Обычно продуценты биологических токсинов рыб – динофлагелляты и цианобактерии (синезеленые водоросли). При этом токсины могут концентрироваться во всем организме или отдельных органах и тканях рыб, присутствовать постоянно или в определенное время года.

Говоря о биотоксинах рыб, чаще всего называют сигуатоксины, относящиеся к классу полициклических полиэфиров, которые вызывают сигуатеру. Источником появления токсина в рыбе служит водоросль – разновидность динофлагеллята *Gambierdiscus toxicus*. Токсин обычно накапливается в коже, голове, внутренностях и икре крупных рифовых рыб: морского окуня, губана, спинорога, крылатки, желтоперого каранкса и амберджека. Сигуатоксин обнаруживают также в барракуде и королевской макрели (Jie, 2020). Как правило, токсин присутствует в рыбе сезонно, с конца весны до окончания лета.

Еще один токсин, продуцируемый динофлагеллятом *Gambierdiscus toxicus*, – майтотоксин, который обладает, вероятно, самым сложным строением из всех известных небелковых веществ природного происхождения. Изначально майтотоксин выделен из рыб вида *Stenochaetus striatus* (полосатый хирург), или “maito” (на таитянском языке). Он может аккумулироваться в организме некоторых промысловых хищных рыб (барракуды, морской окунь, сибас и др.), питающихся полосатым хирургом (Maitotoxin. <https://www.chemistry-world.com/podcasts/maitotoxin/3008759.article>).

Термостойкий нейротоксин сакситоксин свое название получил от наименования моллюска – гигантская камнеломка *Saxidomus giganteus*. По химической природе сакситоксин – пуриновый алкалоид, вырабатываемый некоторыми видами морских динофлагеллят родов *Alexandrium* (*Gonyaulax*) sp., *Gymnodinium* sp., *Pyrodinium* sp., а также пресноводными цианобактериями *Dolichospermum cicinale* и отдельными видами *Anabaena* sp., *Aphanizomenon* spp., *Cylindrospermopsis* sp., *Lyngbya* sp., *Planktothrix* sp., *Scytonema* sp. (Sato et al., 1997; Clark et al., 1999; Smith et al., 2001; Landsberg, 2002; Wiese et al., 2010). Сакситоксины могут встречать-

ся в скумбрии (Solter, Beasley, 2013) и тилапии (Galvão et al., 2009).

Отдельно выделяют так называемую гаффскую, или юксовско-сартланскую, болезнь (алиментарная пароксизмально-токсическая миоглобинурия), связанную с употреблением молоди окуня, ерша, карася, ряпушки, щуки, судака, налима, угря, а также иктиобусов, например большеротого буффало, выловленных в весенне-летний и осенний периоды в некоторых преимущественно закрытых водоемах. У морских видов рыб гаффскую болезнь может вызывать желтохвостый амберджек и синеполосая сельдь (Зарафьянц и др., 2016; Haff disease..., 1998; Onuma et al., 1999).

Заболевание впервые выявили в 1924–1925 гг. в основном среди рыбаков северной части лагуны Фришес-Гафф (ныне Калининградский залив). За последующие 15 лет было зарегистрировано около тысячи сходных случаев (Buchholz et al., 2000). В 1934 г. гаффская болезнь обнаружена в окрестностях Юксовского озера (Ленинградская обл.), вспышки заболевания отмечали в 1948 г. в Карелии, в 1980-х гг. на озере Сартлан в Новосибирской обл., а с 1970 по 2019 гг. – в Хабаровской, Тюменской, Харьковской обл., на Алтае, в Бурятии (побережье озера Котокель), на озере Иткуль Курганской обл. Аналогичные случаи зафиксированы в Швеции в 1948 г., периодически отмечались в США (1984–2014 гг.), Китае (в 2000, 2009 и 2016 гг.), Бразилии (в 2016 г.), но большинство – в Северной и Восточной Европе (Лудупова и др., 2009; Линник и др., 2017; Haff disease..., 1998).

Природа токсина, вызывающего гаффскую болезнь, до сих пор не установлена. В качестве возможной причины заболевания в пресноводных водоемах называют токсины синезеленых водорослей, а в морских – палитоксин, содержащийся в шестилучевых кораллах зоантариях *Palythoa toxica*, *P. tuberculosa*, *P. caribacorum* и др. (Зарафьянц и др., 2016; Ramos, Vasconcelos, 2010).

К временно ядовитым рыбам относят щуку, окуня, налима, усача, белугу, скумбрию, у которых в период нереста могут быть токсичными печень, икра и молоки (Юшкова и др., 2018). Постоянно токсичными свойствами обладают икра и молоки севанской хромюли. Химическая природа токсина икры и молок этих рыб также пока не выяснена.

В звероводстве зафиксированные отравления биотоксинами рыб очень редки: в качестве примера можно упомянуть интоксикацию, вызванную скармливанием пушным зверям желтоперой и белобрюхой камбал, выловленных в прибрежных водах Камчатки (Перельдик и др., 1987). Тем не менее, не исключено, что некоторые неидентифицированные случаи массового падежа на фермах могли быть связаны с потреблением токсических или временно токсических рыб. В дикой природе известны факты массового отравления сакситок-

сином и гибели диких морских выдр на Аляске, тюленей-монахов в Северной Африке, дельфинов во Флориде и др. (Solter, Beasley, 2013).

### ХИМИЧЕСКИЕ ТОКСИНЫ В КОРМАХ ДЛЯ ПУШНЫХ ЗВЕРЕЙ

Общеизвестно, что основные источники загрязнений рек и озер — сточные воды промышленных и сельскохозяйственных предприятий, а также коммунальных хозяйств городов (Никаноров, Жулидов, 1991). Кроме сточных вод в загрязнение Мирового океана дополнительный вклад вносят техногенные катастрофы, бурение подводных скважин, сброс нефтепродуктов морским транспортом, а также глубоководное захоронение радиоактивных отходов (Маловастый, 2013). Однако чаще всего в качестве токсических загрязнителей в водной среде выступают тяжелые металлы, стойкие хлорорганические соединения и в незначительной степени пестициды.

#### *Тяжелые металлы*

Несмотря на то, что большинство тяжелых металлов относят к биогенным элементам, в загрязненных водах гидробионты могут накапливать их до концентраций, во много раз превосходящих допустимый уровень.

Согласно классификации Н.Ф. Реймерса (Дускаев и др., 2014), тяжелыми считаются металлы с плотностью 8 г/см<sup>3</sup>. К ним относят более 40 элементов периодической системы Д.И. Менделеева, из которых 8 контролируют в кормах для сельскохозяйственных животных — это ртуть, кадмий, свинец, медь, мышьяк, цинк, железо, стронций (Дускаев и др., 2014). В звероводстве этот список сужается до 6 элементов.

Наиболее токсичны соединения ртути, которые способны вызывать серьезные отравления всех звеньев пищевой цепи. Рыба, которая, в частности, может стать кормом для пушных зверей, аккумулирует высокие концентрации ртути как из воды, абсорбируя ее поверхностью тела и жабрами, так и с кормом. В воде ртуть с большой скоростью соединяется с органическими веществами и, так как плохо растворяется, становится длительным по времени источником загрязнения (Папазян, 2006).

Особенно опасна метилртуть, которая связывает в организме ферменты путем блокирования сульфгидрильных групп белковых веществ. Метилртуть легко проходит через плацентарный барьер и мозговую ткань, вызывая необратимые последствия в коре головного мозга и мозжечке (Шинетова, Бекеева, 2017).

Показано, что экологически значимое воздействие метилртути (0.5 мг/кг в рационе) может изменять холинергическую систему в определенных

областях мозга американской норки. При этом увеличение уровней мускариновых холинергических рецепторов и активности холинэстеразы после воздействия метилртути подчеркивает ауторегуляторный характер холинергической нейротрансмиссии (Basu et al., 2006).

Симптомы отравления ртутью пушных зверей: анорексия, снижение живой массы, слабость, дрожь, подергивание мускулатуры с последующей атаксией, параличом и апатией; периодически происходят приступы возбуждения с характерным кружением животных.

Примечательно, что в органах норок, разводимых в неволе, отмечают более низкие концентрации ртути, чем у их сородичей в природных популяциях (Evans et al., 2000). В опыте на норках при скормлении им на протяжении 3 мес. ртути в количестве 1.1–15 мг/кг кормосмеси, получены клинические и гистопатологические подтверждения острого токсикоза. Концентрация ртути в головном мозге во всех случаях составила 11.9 мг/кг. В другом эксперименте в рационы норок в течение 145 дней включали 50 и 75% рыбы, содержащей ртуть в количестве 0.44 мг/кг корма, но интоксикации не происходило (Слугин, 2004).

Концентрация ртути в волосяном покрове норки коррелирует ( $r^2 > 0.97$ ) с ее концентрациями в печени, почках, крови и головном мозге. Причем большая часть поступившей в организм метилртути (от 22 до 100%) накапливалась в волосах, создавая градиент концентраций: мех → печень = почки → мозг → кровь (Wang et al., 2014; Evans et al., 2016).

Скорость элиминации метилртути из крови норок составляет 0.05 мкг/день, а отношение уровней метилртути в волосах и в крови — 119, то есть волосы — это основной путь выведения этого соединения из организма (Wang et al., 2014).

Поверхностные воды, загрязненные промышленными стоками, содержат значительные количества кадмия (Тихомирова, Смирнова, 2022). Его содержание больше всего в тканях рыб прибрежной зоны. В больших количествах этот элемент обнаруживается также в растениях, растущих около дорог. В организме животных кадмий, в основном, аккумулируется в печени, почках, костной ткани и волосяном покрове, наиболее опасна концентрация >20 мг/кг, которая может приводить к летальному исходу (Ягодин и др., 2002).

Содержание кадмия в мышечной ткани рыб обычно невысокое (до 0.07 мг/кг), по сравнению с другими тяжелыми металлами. Но концентрация его в печени у долгоживущих видов — зубатки, черного палтуса и морского окуня — может достигать до 12 мг/кг (Загрязнители, пища, здоровье, 1999; Ягодин и др., 2002).

Избыток кадмия в рационе вызывает снижение роста молодняка пушных зверей, угнетение работы почек, центральной нервной и репродук-

тивной систем (Бингам и др., 1993). Минимально допустимый уровень кадмия в комбикорме для откармливаемых сельскохозяйственных животных — 0.5 мг/кг — применим и в звероводстве.

Свинец — естественная составная часть тканей растений и животных, в микродозах — это жизненно необходимый элемент, но в повышенных концентрациях он токсичен, а в высоких — вызывает падеж зверей.

Растворенного свинца в речных водах в среднем 10 мкг/л (ПДК 0.03 мг/л) при значительных колебаниях в разных районах (Мур, Рамамурти, 1987). У рыб свинец накапливается преимущественно в жабрах, печени, почках и костях (Загрязнители, пища, здоровье, 1999).

При остром отравлении свинцом наблюдается беспокойство животных, снижение поедаемости кормосмеси, повышенное слюноотделение, диарея. При хроническом отравлении — снижение роста молодняка, запоры, слабость, гастроэнтерит, нарушение работы печени и почек. Часто наступает летальный исход. Допустимый уровень свинца в кормосмеси для пушных зверей — <5 мг/кг.

Мышьяк обычно не накапливается ни в пресноводных, ни в морских видах рыб. Следовательно, он не представляет угрозы для пушных зверей, разве что за исключением вылова рыбы из крайне загрязненных участков. Тем не менее, максимально допустимый уровень мышьяка в кормосмеси для пушных зверей ограничивается количеством 2 мг/кг.

Это же относится и к цинку. Этот элемент сосредоточен в основном в костях, печени, жабрах, много цинка в глазах и гонадах рыб, что связано с его важной ролью в функционировании органов зрения и развитии половых продуктов. Цинк поступает в организм рыб как из корма, так и из воды. Высокое содержание цинка в воде — до 0.3 мг/л, часто вызванное загрязнением водоемов промышленными отходами, может оказывать токсическое воздействие на организм рыб. Но даже токсичная для рыб концентрация цинка в мышечной ткани до 20–45 мг/кг, против 1–6 мг в норме, оказывается значительно меньше его допустимого количества в кормосмеси для пушных зверей — 250 мг/кг.

Здесь, очевидно, необходимо учитывать видовые особенности. Так, у хорьков цинк в форме окиси вызывает токсикоз в концентрации более 500 мг/кг, а в количестве больше 3000 мг/кг приводит к гибели в течение 2 нед. (Bernard et al., 1984).

Известно, что медь в корме положительно влияет на рост сельскохозяйственных животных. В связи с чем звероводы иногда сознательно идут на дополнительное включение препаратов меди в корм для пушных зверей. Стимуляция роста с использованием препаратов меди усиливается при добавлении в корм биотина (витамин B7). На до-

бавку меди положительно реагируют также животные, получающие в составе рациона рыбную муку, что обусловлено очень слабой доступностью меди из этого вида корма.

При этом излишне большие дозы меди могут оказаться токсичными (Слугин, 2004). Медь при избытке, накапливаясь в печени, нарушает ее функцию. Хронический медный токсикоз чаще всего возникает при низком потреблении молибдена и серы с пищей. Снижение образования комплексов молибдата меди или сульфида меди в тканях ухудшает выведение меди с мочой или калом. Острый токсикоз меди вызывает тяжелый гастроэнтерит, характеризующийся анорексией, диареей, обезвоживанием. Хроническая токсичность меди встречается редко (Barceloux, 1999; Casarett et al., 2001).

Тем не менее, на растущем молодняке норок, начиная с 10-недельного возраста, не выявлено токсического влияния добавок меди в дозе 50–200 мг/кг корма при совместном использовании с биотином (Bush et al., 1995). В то же время сообщается о снижении уровня гемоглобина у растущего молодняка пастелевых норок (самцы) при повышении дозировки меди до 300 мг/кг корма и о 50%-ной смертности при 320 мг/кг (Brand, 1983). Фактически же допустимый уровень меди для пушных зверей составляет 80 мг/кг корма.

Иногда отравление тяжелыми металлами усиливается в присутствии других токсических веществ. Например, наличие в кормосмеси полихлорированных бифенилов увеличивает отложение кадмия в почках норок с 0.26 до 0.41 мг/кг.

#### *Стойкие хлорорганические соединения*

Известно, что водные биологические ресурсы обладают способностью к аккумуляции различных загрязнителей, в том числе хлорорганических соединений (ХОС). К ХОС относят соединения, включенные в список наиболее опасных органических загрязнителей, которые могут по-разному накапливаться в организме рыб в зависимости от содержания в ней жира, положения в пищевой цепи, района промысла, антропогенных факторов и др. (Роотс, 1992). Кроме того, показаны отличия в содержании ХОС в различных органах и тканях рыб (Shelepchikov et al., 2008; Rodjuk et al., 2012).

В последние годы уделяется повышенное внимание анализу стойких органических загрязнителей, которые воздействуют на окружающую среду на чрезвычайно низком уровне (нижний предел обнаружения —  $10^{-8}$ – $10^{-13}$ %). К таким соединениям относят полихлорированные диоксины, дибензофураны, полихлорированные дифенилы, а также хлорорганические пестициды. Все они относятся к классу ХОС и обладают рядом специфических признаков: биоконцентрирование; низкая растворимость в воде и высокая — в жирах и липидах;

способность переноситься на большие расстояния; глобальная распространенность; чрезвычайная стойкость к физическим, химическим и биологическим изменениям; токсическое воздействие на организмы в крайне малых дозах.

Программа ООН по окружающей среде – UNEP (United Nations Environmental Project) – особо выделяет 12 соединений и групп, на которые следует обращать первоочередное внимание при экологических исследованиях. Это полихлорированные бифенилы (ПХБ), полихлорированные дибензо-*p*-диоксины (ПХДД), полихлорированные дибензофураны (ПХДФ), алдрин, диэлдрин, дихлор-дифенил-трихлорэтан (ДДТ), эндрин, хлордан, гексахлорбензол (ГХБ), мирекс, токсафен и гептахлор (Юфит, 2002).

Среди стойких органических загрязнителей ПХБ – одни из самых распространенных. Они массово выпускались и использовались начиная с 1929 г. С тех пор и до прекращения их промышленного выпуска в 1986 г. в мире было произведено около 2 млн т ПХБ.

ПХБ относят к классу ароматических соединений, состоящих из двух бензольных колец, соединенных через межъядерную связь С–С с замещением от одного до десяти атомами хлора в орто-, мета- или параположениях. Существует 209 индивидуальных конгенов ПХБ, отличающихся числом и положением атомов хлора в молекуле, имеющих общую формулу:  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ , где  $n = 1-10$ .

По своим физико-химическим свойствам конгены ПХБ близки к диоксинам. ПХБ обладают исключительными теплофизическими и электроизоляционными характеристиками, термостойкостью, инертностью по отношению к кислотам и щелочам, огнестойкостью, хорошей растворимостью в жирах, маслах и органических растворителях, высокой совместимостью со смолами и адгезионной способностью (Занавескин, Аверьянов, 1998). Это обусловило их широчайшее применение в качестве диэлектриков в трансформаторах и конденсаторах, гидравлических жидкостей, теплоносителей и хладагентов, смазочных масел, компонентов красок, лаков и клеевых составов, пластификаторов и наполнителей в пластмассах и эластомерах, антипиренов, растворителей. Смеси подобных ХОС известны под различными фирменными названиями – Арохлор (США), Канехлор (Япония), Хлорфен (Германия), Делор (Словакия), Фенохлор (Франция), Фенхлор (Италия), Совол и Совтол (СССР, Россия).

Характер и динамика распределения ПХБ в окружающей среде во многом определяются их физическими свойствами: химической инертностью, достаточно высокой плотностью паров и способностью сорбироваться на частицах. Несмотря на постепенное сокращение применения

ПХБ в хозяйственной деятельности, они продолжают загрязнять окружающую среду, и в настоящее время эти токсичные продукты распространены по всему Земному шару и присутствуют в организме каждого живого существа. По мере включения ПХБ в биологические пищевые цепи происходит прогрессивная потеря низкохлорированных компонентов благодаря их селективной биотрансформации. Поэтому в живых организмах накапливаются наиболее опасные высокохлорированные ПХБ (Клюев, Бродский, 2000).

Сильное загрязнение ПХБ и диоксинами Великих озер (США, Канада) создает условия для проведения исследований по влиянию стойких ХОС, поступающих с выловленной рыбой, на продуктивность пушных зверей, разводимых на фермах.

Для норок разработаны рационы, составленные таким образом, чтобы заменить океаническую рыбу карпом залива Сагино (оз. Гурон) и обеспечить концентрацию ПХБ – 0.25; 0.5 и 1 мг/кг корма. Непрерывное воздействие ПХБ в концентрации 0.25 мг/кг задерживает начало эструса и снижает число щенений у самок норок. Пометы, рожденные самками, подвергавшимися воздействию 0.5 мг/кг ПХБ, характеризуются высокой смертностью и меньшей массой тела, чем контрольная группа. Воздействие ПХБ в концентрации 1 мг/кг оказывает влияние на концентрацию тиреоидных гормонов Т4 и Т3 в сыворотке крови. По сравнению с контрольной группой норок, наблюдаются значимые различия в весе почек, печени, головного мозга, селезенки, сердца и щитовидной железы. При возрастающих концентрациях ПХБ отмечено увеличение частоты перипортального и диффузного вакуолярного гепатоцеллюлярного липидоза у норок. При этом даже кратковременное кормление карпом, загрязненным ПХБ, животных родительского стада за несколько месяцев до начала гона, оказывает пагубное влияние на выживаемость их потомков.

Согласно ранее проведенному исследованию влияния остатков ПХБ и диоксинов в рыбе Великих озер (каarp, присоска, окунь, сиг, рыбная мука из сероспинки) при скармливании ее норкам, установлено, что к концу роста молодняка ПХБ Аroclor 1254 накапливается в подкожном жире норок в 38 раз больше, чем его содержится в рационе. А некоторые конгены ПХБ увеличивают свою концентрацию до 200 раз. Всего период полураспада ПХБ в жировой ткани норок составлял 98 дней (Hornshaw et al., 1983).

Постоянное кормление норок карпом из залива Сагино с высоким содержанием ПХБ индуцирует активность цитохрома P-4501A1. Реакция активности этого печеночного фермента в зависимости от концентрации ПХБ и отсутствие индукции после перевода зверей на незагрязненную диету определяют возможность его использования в качестве

потенциального маркера для подобных химических индукторов-загрязнителей (Shipp et al., 1998).

Как и Великие озера, р. Гудзон в США сильно подвержена загрязнению. В 2018 г. Департамент охраны окружающей среды штата Нью-Йорк – NYSDEC (New York State Department of Environmental Conservation) выпустил список участков русла р. Гудзон, имеющих ухудшенное качество воды из-за присутствия ПХБ, кадмия и других токсичных соединений (Final..., 2018).

У норок, выращиваемых на ферме, оценивали кумулятивный эффект, связанный с потреблением рыбы из верховий р. Гудзон, загрязненной ПХБ. Как показали исследования, суммарные концентрации ПХБ и токсического эквивалента (ТЭ) по 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*p*-диоксину (van den Berg et al., 2006) в сухих экскрементах самцов обычно увеличиваются с ростом их концентрации в рационе и отражают соответствующее повышение концентраций ПХБ и ТЭ в печени (Bursian et al., 2018).

Ранее сходные эксперименты проводили на норках, в рацион которым добавляли рыбу (серебряный карась и сазан), выловленную в р. Хусатоник (США). В зависимости от группы, рацион содержал от 0.22 до 3.54% рыбы, что обеспечивало от 0.34 до 3.7 мкг суммарного количества ПХБ в 1 г корма или 3.5–69 пг ТЭ/г. Самок норки начинали кормить экспериментальным рационом за восемь недель до гона вплоть до отъема родившегося молодняка в возрасте 6 недель. Молодняк содержали на рационе с ПХБ до возраста 180 дней.

Концентрация ПХБ в рационе матерей, вызывающая снижение выживаемости подсосных щенков, составляет 3.7 мкг суммарных ПХБ (ΣПХБ) на г корма (69 пг ТЭ/г), с концентрацией в печени матерей 3.1 мкг ΣПХБ/г сырого вещества (218 пг ТЭ/г).

Пролиферация клеток нижней и верхней челюстей проявляется у щенков в возрасте 31 недели при уровне ПХБ в рационе – 0.96 мкг ΣПХБ/г корма (9.2 пг ТЭ/г), концентрация ΣПХБ в печени животных этой группы составляет 1.7 мкг/г сырого вещества (40 пг ТЭ/г) (Bursian et al., 2006).

Оценено (Folland et al., 2016) влияние воздействия Aroclor 1268 на размножение, рост и смертность щенков норки. Концентрация ΣПХБ с включением в рацион норки Aroclor 1268 варьировала от 1.8 до 29 мкг/г сырого вещества корма. Снижение среднего размера помета, роста и выживаемости молодняка отмечено при концентрации ΣПХБ в рационе 10.6 мкг/г и выше.

Сходное с ПХБ влияние на зверей оказывают и токсические вещества массового загрязнения морской среды – ПХДФ.

При оценке влияния 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*p*-диоксина (ТХДД), 2,3,4,7,8-пентахлордibenзофурана (ПeХДФ) и 2,3,7,8-тетрахлордibenзофурана (ТХДФ) в концентрации 2.1–8.4, 4.0–15 и

5.2–25 нг/кг массы на репродуктивную функцию самок норки, на жизнеспособность и рост их потомства не обнаружено никаких устойчивых отрицательных эффектов. Полученные данные контрастируют с сообщениями по норкам, подвергшимся воздействию смесей ПХБ, и позволяют утверждать, что коэффициенты токсичности Всемирной организации здравоохранения по некоторым конгенерам могут не подходить для норки (Moore et al., 2012).

Эффекты экологически значимых концентраций эквивалентов ТХДД, ТХДФ и ПeХДФ или смеси из двух конгенов на активность фермента печени цитохрома P450 и морфологию тканей, включая гистологию челюсти, определяли у норки в контролируемых условиях фермы. Взрослым самкам норки давали корм с добавлением ТХДД, ТХДФ, ПeХДФ или смеси каких-либо из двух конгенов в течение 180 дней. Эффекты экологически значимых концентраций эквивалентов этих конгенов определяли по активности ферментов печени – цитохрома P450, этоксирезорифин-*O*-деэтилазы (ЭРОД) и метоксирезорифин-*O*-деэтилазы (МРОД), а также по изменению морфологии тканей, включая гистологию челюсти. Установлено, что активность ЭРОД и МРОД может быть использована в качестве чувствительных маркеров воздействия ПeХДФ и ТХДФ на взрослых самок норки, причем реакция индукции ЭРОД/МРОД происходила при дозах, которые были меньше, чем те, которые необходимы, чтобы вызвать гистологические или морфологические изменения (Moore et al., 2009).

### *Пестициды и удобрения*

Пестициды характеризуются биологической активностью, циркуляцией в биосфере, наличием остаточных количеств в растениях, стойкостью в естественных условиях, передачей и накоплением в биологических объектах.

По химической структуре пестициды классифицируют на следующие группы: хлорорганические (хлориндан, гептахлор, хлортен, полихлорпинен), включая устойчивые ХОС, фосфорорганические (карбофос, хлорофос, метафос, тиофос); ртутьорганические (гранозан, меркуран, меркур-гексан); соединения мышьяка (арсенат натрия, арсенат кальция, парижская зелень); производные карбаминовой кислоты (бетанол, карбин, севин и др.). В зависимости от назначения пестициды подразделяют на зооциды, инсектоакарициды, гербициды и фунгициды.

Отравление инсектоакарицидами плотоядных пушных зверей возможно при обработке клеток или их самих от эктопаразитов. От зооцидов чаще всего гибнут дикие пушные звери, например, лисы при использовании на полях фосфида цин-

ка и других фосфорорганических соединений, применяемых для борьбы с грызунами. При этом интоксикация пестицидами через растительные корма встречается гораздо реже. К тому же некоторые наиболее опасные пестициды (гранозан, нитицид и др.) запрещены к использованию на территории РФ.

Токсическое действие гербицидов также не одинаково. В частности, высокими токсикологическими свойствами обладают тетраметилтиурамдисульфид (ТМТД) и 4,6-динитро-о-крезол (ДНОК). ТМТД используют для обработки семян зерновых; ДНОК применяют на плодово-ягодных культурах.

Помимо пестицидов, потенциальную опасность для пушных зверей могут представлять азотистые соединения, входящие в состав различных растительных удобрений, которые подвергаются нитрификации в почве с образованием нитратов и нитритов.

Однако корма овощной группы как наиболее вероятный источник нитратов и нитритов звери получают с рационом в небольших количествах, что исключает опасность отравления. Возможно, именно с этим связано отсутствие действующего норматива ПДК на нитраты и нитриты в питьевой воде и кормах для пушных зверей.

В долгосрочном эксперименте на взрослых самках норок использование нитритов в дозировке 30–50 мг/кг корма только на третий год привело к изменению печеночных вен и развитию гемангиоэндотелиомы печени. Патоморфологические изменения указывали на образование N-нитрозодиметиламина (НДМА) *in vivo* (Korppang, Helgebostad, 1987).

Из кормов, используемых в звероводстве, содержание НДМА, являющегося сильным канцерогеном, контролируют только в рыбной муке, LD<sub>50</sub> для голубых песцов составляет 10 мг/кг и для норок – 7 мг/кг. Впервые высокие концентрации НДМА были обнаружены в 1957–1962 гг. в сельдовой рыбной муке, где НДМА применяли в качестве консерванта (Слугин, 2004).

В заключение хотелось добавить, что, кроме перечисленных случаев, корма для пушных зверей могут становиться токсичными из-за повышенных концентраций хлорида натрия (иногда рыбная мука производится из соленой рыбы), мочевины, применяемой в качестве фальсификата протеина, или большого количества гормонов и биологически активных веществ при использовании кормов, включающих железы внутренней секреции убойного скота теплокровных животных (семенники, надпочечники, вилочковая и поджелудочная железы) (Зарафьянц и др., 2016).

Однако это достаточно редкие случаи, поэтому в представленном обзоре сделана попытка дать по возможности максимально полное описание наиболее распространенных и потенциально опасных

токсинов, обнаруживаемых в кормовом сырье и готовых кормах для пушных зверей.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, специфика звероводства выводит на первый план проблему качества кормов. Чтобы эффективно решить ее, требуется комплекс мероприятий, включающих соблюдение технологий заготовки, хранения, перевозки и переработки, а также лабораторную оценку входного кормового сырья и готовой кормосмеси, разработку и внедрение новых норм предельно допустимых концентраций вредных веществ. При этом важно учитывать особенности биологии пушных зверей и видоспецифичную восприимчивость к тем или иным токсинам.

В связи с этим, существенно возрастает роль ветеринарно-санитарного надзора, который должен представлять отлаженную систему непрерывного повседневного контроля качества корма с обязательным включением анализов на общую токсичность и присутствие биозагрязнений на кормокухне, в кормораздатчиках, кормушках и поилках для пушных зверей. Подобные превентивные меры способны предупредить занос инфекции, появление кормовых заболеваний и обеспечить экономическую эффективность за счет предотвращения падежа и возможных затрат на лечение зверей.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная статья представляет собой обзор, авторы не проводили исследований с участием животных и людей.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ахмадышин Р.А., Канарский А.В., Канарская З.А. Микотоксины – контаминанты кормов // Вестн. Казан. технол. ун-в. 2007. № 2. С. 88–103.
- Берестов В.А., Таранов Г.С. Лабораторные методы оценки качества кормов в звероводстве. Петрозаводск: Карелия, 1983. 80 с.
- Бингам Ф.Т., Коста М., Эйхенбергер Э. и др. Некоторые вопросы токсичности ионов металлов. М.: Мир, 1993. 366 с.
- Буркин А.А., Кононенко Г.П., Кислякова О.С. Актуальность изучения проблемы охратоксикоза в России // Успехи мед. микол. 2003. Т. 1. С. 122–123.
- Госманов Р.Г., Волков А.Х., Галиуллин А.К., Ибрагимова А.И. Санитарная микробиология. СПб.: Лань, 2010. 246 с.
- Гранкина А.С., Голякевич З.С. Бактериальная обсемененность кормов животного и растительного происхождения, используемых в животноводстве // Биотика. 2016. Т. 4 (11). С. 29–35.

- Дускаев Г.К., Мирошников С.А., Сизова Е.А. и др.* Влияние тяжелых металлов на организм животных и окружающую среду обитания (обзор) // *Вестн. мяс. скотовод.* 2014. № 3 (86). С. 7–11.
- Жуленко В.Н., Рабинович М.И., Таланов Г.А.* Ветеринарная токсикология / Ред. В.Н. Жуленко. М.: КолосС, 2004. 384 с.
- Загрязнители, пища, здоровье // *Хранение и переработка сельхозсырья.* 1999. № 9. С. 22–26.
- Занавескин Л.Н., Аверьянов В.А.* Полихлорбифенилы: проблемы загрязнения окружающей среды и технологические методы обезвреживания // *Усп. химии.* 1998. № 8. С. 788–800.
- Зарафьянц Г.Н., Круть М.И., Сашко С.Ю.* Судебно-медицинская экспертиза пищевых отравлений. СПб.: СПбГУ, 2016. 86 с.
- Клюев Н.А., Бродский Е.С.* Определение полихлорированных бифенилов в окружающей среде и биоте. Полихлорированные бифенилы. Супертоксиканты XXI века // *Инф. вып. ВИНТИ.* 2000. № 5. С. 31–63.
- Линник В.Я., Красочко С.М., Дегтярик С.М.* Справочник по болезням пресноводных, морских и аквариумных рыб. Минск: Беларуская навука, 2017. 261 с.
- Лисицын А.Б., Туниева Е.К., Горбунова Н.А.* Окисление липидов: механизм, динамика, ингибирование // *Все о мясе.* 2015. № 1. С. 10–15.
- Лудупова Е.Ю., Сергеева Л.А., Гыргешкинова Н.С. и др.* Случай возникновения Гаффской болезни (алиментарно-токсической пароксизмальной миоглобинурии) в Республике Бурятия в селах Прибайкальского района, расположенных у озера Котокель // *Бюл. ВСНЦ СО РАМН.* 2009. Т. 67 (3). С. 92–94.
- Маловастый К.С.* Диагностика болезней и ветсанэкспертиза рыбы. СПб.: Лань, 2013. 509 с.
- Монастырский О.А., Першакова Т.В.* Современные проблемы и решения создания биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных культур от возбудителей болезней // *Агро XXI.* 2009. № 7–9. С. 3–5.
- Мур Дж.В., Раммурти С.* Тяжелые металлы в природных водах: контроль и оценка влияния. М.: Мир, 1987. 285 с.
- Никаноров А.М., Жулидов А.В.* Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах. Л.: Гидрометеоздат, 1991. 311 с.
- Овсянкина А.В.* Фузариозные микотоксины, загрязняющие зерно и вызывающие болезни животных и человека // *Теор. практ. борьбы паразитар. болез. живот.* 2013. Т. 14. С. 281–284.
- Папаян Т.* Микотоксины: экономический риск и контроль // *Комбикорма.* 2006. № 1. С. 77–78.
- Перельдик Н.Ш., Милованов Л.В., Ерин А.Т.* Кормление пушных зверей М.: Агропромиздат, 1987. 350 с.
- Повреждающее действие на клетку бактериальных токсинов // *РМЖ.* 1999. № 6. С. 7.
- Подсосонная М.А., Родина Т.Г.* Проблема гистамина в рыбной продукции // *Изв. вузов. Пищ. технол.* 2004. № 1. С. 30–32.
- Роотс О.* Полихлорированные бифенилы и хлорорганические пестициды в экосистеме Балтийского моря. Таллин: Тал. техн. унив., 1992. 181 с.
- Самсонов А.И.* Разработка средств профилактики микотоксикозов норок: Дис. ... канд. биол. наук. Казань: ФЦТРБ, 2008. 140 с.
- Слугин В.С.* Болезни плотоядных пушных зверей и их этиологическая связь с патологией других животных и человека. Киров: КОГУП “Кировская областная типография”, 2004. 592 с.
- Таболин В.А., Яковлев М.Ю., Ильина А.Я. и др.* Патогенетические механизмы и клинические аспекты действия термостабильного эндотоксина кишечной микрофлоры (обзор литературы) // *РМЖ.* 2003. № 3. С. 126.
- Тихомирова В.В., Смирнова П.С.* Загрязнение поверхностных и сточных вод Российской Федерации тяжелыми металлами // *Международ. науч.-иссл. журн.* 2022. № 10 (124). С. 1–5.
- Тремасов М.Я.* Профилактика микотоксикозов животных в России // *Ветеринария.* 2002. № 9. С. 3–8.
- Тремасов М.Я.* Микотоксикозы – проблема распространения и профилактики в животноводстве // *Мат. Всерос. науч.-практ. конф., посвященной 45-летию ФГНУ ВНИВИ (Казань, 14–15 апреля 2005 г.).* Казань: ФГНУ ВНИВИ, 2005. С. 41–51.
- Тутельян В.А., Кравченко Л.В.* Микотоксины (медицинские и биологические аспекты). М.: Медицина, 1985. 320 с.
- Шинетова Л.Е., Бекеева С.А.* Современные представления о влиянии различных форм ртути на организм // *Вестн. КазНМУ.* 2017. № 1. С. 370–375.
- Юфим С.С.* Яды вокруг нас. Вызов человечеству. М.: Классик стиль, 2002. 366 с.
- Юшкова Л.Я., Юдаков А.В., Шихалева Н.Л. и др.* Значение изучения и ВСЭ ядовитых рыб // *Norw. J. Dev. Int. Sci.* 2018. № 20. P. 67–70.
- Ягодин Б.А., Жуков Ю.П., Кобзаренко В.И.* Агрехимия. М.: Колос, 2002. 582 с.
- Bahl M.I., Honoré A.L., Skonager S.T. et al.* The microbiota of farmed mink (*Neovison vison*) follows a successional development and is affected by early life antibiotic exposure // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 20434.
- Barceloux D.G.* Copper // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1999. V. 37 (2). P. 217–230.  
<https://doi.org/10.1081/clt-100102421>
- Basu N., Scheuhammer A.M., Rouvinen-Watt K. et al.* Methylmercury impairs components of the cholinergic system in captive mink (*Mustela vison*) // *Toxicol. Sci.* 2006. V. 91 (1). P. 202–209.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj121>
- Baylis C.L.* Enterobacteriaceae // *Food spoilage microorganisms* / Ed. C.W. Blackburn. Cambridge: Woodhead Publ. Ltd., 2006. P. 624–667.  
<https://doi.org/10.1533/9781845691417.5.624>
- Ben-Gigirey B., Vieites Baptista de Sousa J.M., Villa T.G., Barros-Velazquez J.* Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage // *J. Food Prot.* 1998. V. 61 (5). P. 608–615.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-61.5.608>
- Bennett J.W., Klich M.* Mycotoxins // *Clin. Microbiol. Rev.* 2003. V. 16 (3). P. 497–516.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>

- Bernard S.L., Gorham J.R., Ryland L.M. Biology and diseases of ferrets. Ch. 12 // Laboratory animal medicine / Eds J.G. Fox, B.J. Cohen, F.M. Loew. Orlando, Florida: Acad. Press Inc., 1984. P. 386–396.
- Biström M., Moisander-Jylhä A.M., Heinikainen S. et al. Isolation of *Clostridium limosum* from an outbreak of metritis in farmed mink // Acta Vet. Scand. 2016. V. 58 (1). P. 49.  
<https://doi.org/10.1186/s13028-016-0230-7>
- Bonna R.J., Aulerich R.J., Bursian S.J. et al. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate and activated charcoal in reducing the toxicity of dietary aflatoxin to mink // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1991. V. 20 (3). P. 441–447.  
<https://doi.org/10.1007/BF01064418>
- Börsting C.F., Engberg R.M., Jensen S.K., Damgaard B.M. Effects of high amounts of dietary fish oil of different oxidative quality on performance and health of growing-furring male mink (*Mustela vison*) and of female mink during rearing, reproduction and nursing periods // J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 2009. V. 79 (1–5). P. 210–223.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1998.tb00644.x>
- Brandt A. Effect of dietary copper and zinc on the haematology of male pastel mink kits // Scientifur. 1983. V. 7 (2). P. 61–65.
- Buchholz U., Mouzin E., Dickey R. et al. Haff disease: from the Baltic Sea to the U.S. shore // Emerg. Infect. Dis. 2000. V. 6 (2). P. 192–195.  
<https://doi.org/10.3201/eid0602.000215>
- Bursian S., Kern J.W., Remington R.E., Link J.E. Use of polychlorinated biphenyl and toxic equivalent concentrations in scat from mink (*Neovison vison*) fed fish from the upper Hudson River to predict dietary and hepatic concentrations and health effects // Environ. Toxicol. Chem. 2018. V. 37 (2). P. 563–575.  
<https://doi.org/10.1002/etc.3997>
- Bursian S.J., Mitchell R.R., Yamini B. et al. Efficacy of a commercial mycotoxin binder in alleviating effects of ochratoxin A, fumonisin B1, moniliformin and zearalenone in adult mink // Vet. Hum. Toxicol. 2004. V. 46 (3). P. 122–129.
- Bursian S.J., Sharma Ch., Aulerich R.J. et al. Dietary exposure of mink (*Mustela vison*) to fish from the Housatonic river, Berkshire County, Massachusetts, USA: effects on organ weights and histology and hepatic concentrations of polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxic equivalence // Environ. Toxicol. Chem. 2006. V. 25 (6). P. 1541–1550.  
<https://doi.org/10.1897/05-407r.1>
- Bush C.R., Restum J.C., Bursian S.J. et al. Responses of growing mink to supplemented dietary copper and biotin // Scientifur. 1995. V. 19 (2). P. 141–147.
- Casarett L.J., Doull J., Klaassen C.D. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. N.Y.: McGraw-Hill Medical Publ. Divis. Coll., 2001. 1236 p.
- Chen T., Heflich R.H., Moore M.M., Mei N. Differential mutagenicity of aflatoxin B1 in the liver of neonatal and adult mice // Environ. Mol. Mutagen. 2010. V. 51 (2). P. 156–163.  
<https://doi.org/10.1002/em.20518>
- Chytiri S., Chouliara E., Savvaidis I.N., Kontominas M. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout // Food Microbiol. 2004. V. 21 (2). P. 157–165.  
[https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00059-5)
- Clark R.F., Williams S.R., Nordt S.P., Manoguerra A.S. A review of selected seafood poisonings // Undersea Hyperb. Med. 1999. V. 26 (3). P. 175–184.
- Clausen T.N., Damgaard B.M., Borsting C.F., Hejlesen C. Fatty and defatted herring scrap fed to mink (*Mustela vison*) in the reproduction and nursing periods // Canad. J. Anim. Sci. 1999. V. 79 (4). P. 457–465.
- Damgaard B.M., Borsting C.F., Engberg R.M., Jensen S.K. Effects of high dietary levels of fresh or oxidised fish oil on performance and blood parameters in female mink (*Mustela vison*) during the winter, reproduction, lactation and early growth periods // Acta Agric. Scand. Sect. A. Anim. Sci. 2003. V. 53. P. 136–146.  
<https://doi.org/10.1080/09064700310011198>
- Dietz H.H., Chriél M., Andersen T.H. et al. Outbreak of *Salmonella* Dublin-associated abortion in Danish fur farms // Can. Vet. J. 2006. V. 47 (12). P. 1201–1205.
- Evans R.D., Addison E.M., Villeneuve J.Y. et al. Distribution of inorganic and methylmercury among tissues in mink (*Mustela vison*) and otter (*Lutra canadensis*) // Environ. Res. 2000. V. 84 (2). P. 133–139.  
<https://doi.org/10.1006/enrs.2000.4077>
- Evans R.D., Grochowina N.M., Basu N. et al. Uptake of selenium and mercury by captive mink: results of a controlled feeding experiment // Chemosphere. 2016. V. 144. P. 1582–1588.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.096>
- Final New York State 2018. Section 303(d). List of impaired waters requiring a TMDL/Other strategy. Albany, N.Y.: New York State Department of Environmental Conservation (NYSDEC). May 26. 2018.
- Folland W.R., Newsted J.L., Fitzgerald S.D. et al. Growth and reproductive effects from dietary exposure to Aroclor 1268 in mink (*Neovison vison*), a surrogate model for marine mammals // Environ. Toxicol. Chem. 2016. V. 35 (3). P. 604–618.  
<https://doi.org/10.1002/etc.3201>
- Galvão J.A., Oetterer M., Bittencourt-Oliveira M.C. et al. Saxitoxins accumulation by freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*) for human consumption // Toxicon. 2009. V. 54 (6). P. 891–894.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.021>
- Haff disease associated with eating buffalo fish – United States, 1997 // Morb. Mortal. Wkly Rep. 1998. V. 47 (50). P. 1091–1093.
- Halasz A., Baráth Á., Simon-Sarkadi L., Holzapfel W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food // Tr. Food Sci. Technol. 1994. V. 5 (2). P. 42–49.  
[https://doi.org/10.1016/0924-2244\(94\)90070-1](https://doi.org/10.1016/0924-2244(94)90070-1)
- Hänninen M.L., Ekman T., Saranpää T., Valtonen M. The occurrence of thermophilic *Campylobacter* in mink and an experimental oral infection of pregnant mink by *Campylobacter jejuni* // Acta Vet. Scand. 1988. V. 29 (3–4). P. 463–468.  
<https://doi.org/10.1186/BF03548643>
- Hansen J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Danish production animals. Ph. D thesis. Lyngby: Tech. Univ. Denmark, Nat. Vet. Inst., 2018. 127 p.

- Hansen J.E., Larsen A.R., Skov R.L. et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is widespread in farmed mink (*Neovison vison*) // Vet. Microbiol. 2017. V. 207. P. 44–49.
- Høg B.B., Ellis-Iversen J., Sönksen U.W. et al. DANMAP 2018: use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Copenhagen: Nat. Food Inst., Statens Serum Institut, 2019. 176 p.
- Hornshaw T.C., Aulerich R.J., Johnson H.E. Feeding Great Lakes fish to mink: effects on mink and accumulation and elimination of PCBs by mink // J. Toxicol. Environ. Health. 1983. V. 11 (4–6). P. 933–946. <https://doi.org/10.1080/15287398309530396>
- Hungerford J.M. Scombroid poisoning: a review // Toxicol. 2010. V. 56 (2). P. 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2010.02.006>
- Hunter D.B., Prescott J.F., Pettit J.R., Snow W.E. *Campylobacter jejuni* as a cause of abortion in mink // Can. Vet. J. 1983. V. 24 (12). P. 398–399.
- Jestoi M. Emerging *Fusarium* mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin: a review // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2008. V. 48 (1). P. 21–49. <https://doi.org/10.1080/10408390601062021>
- Jie Y.Sh. Fishes carrying this incurable poison are on the rise // Medium. Retr. 2020–03–22. <https://medium.com/microbial-instincts/fishes-carrying-this-incurable-poison-are-on-the-rise-2de5de37509b>
- Kanki M., Yoda T., Tsukamoto T., Shibata T. *Klebsiella pneumoniae* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68 (7). P. 3462–3466. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3462-3466.2002>
- Koppang N., Helgebostad A. Vascular changes and liver tumours induced in mink by high levels of nitrite in feed // IARC Sci. Publ. 1987. V. 84. P. 256–260.
- Křižek M., Pavliček T., Vácha F. Formation of selected biogenic amines in carp meat // J. Sci. Food Agric. 2002. V. 82 (9). P. 1088–1093. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1154>
- Landsberg J.H. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms // Rev. Fish. Sci. 2002. V. 10 (2). P. 113–390. <https://doi.org/10.1080/20026491051695>
- Lindström M., Nevas M., Kurki J. et al. Type C botulism due to toxic feed affecting 52000 farmed foxes and minks in Finland // J. Clin. Microbiol. 2004. V. 42 (10). P. 4718–4725. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4718-4725.2004>
- Lyhs U., Frandsen H., Andersen B. et al. Microbiological quality of mink feed raw materials and feed production area // Acta Vet. Scand. 2019. V. 61 (1). P. 56. <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0489-6>
- Maitotoxin. <https://www.chemistryworld.com/podcasts/maitotoxin/3008759.article>
- Meissonnier G.M., Pinton P., Laffitte J. et al. Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2008. V. 231 (2). P. 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.04.004>
- Mittelholzer C., Hedlund K., Englund L. et al. Molecular characterization of a novel astrovirus associated with disease in mink // J. Gen. Virol. 2003. V. 84. P. 3087–3094.
- Moore J.N., Newsted J.L., Hecker M. et al. Hepatic P450 enzyme activity, tissue morphology and histology of mink (*Mustela vison*) exposed to polychlorinated dibenzofurans // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2009. V. 57 (2). P. 416–425. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9241-9243>
- Moore J.N., Zwiernik M.J., Newsted J.L. et al. Effects of dietary exposure of mink (*Mustela vison*) to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran on reproduction and offspring viability and growth // Environ. Toxicol. Chem. 2012. V. 31 (2). P. 360–369. <https://doi.org/10.1002/etc.739>
- Murray J., Burt J.R. Composition of fish // Torry advisory note № 38. Ministry of Technology. Aberdeen, U.K.: Torry Research Station, 2001. 14 p.
- Nikolaisen N.K., Fertner M., Lassen D.C.K. et al. Association between antibiotic consumption and resistance in mink production // Antibiotics. 2022. V. 11 (7). P. 927. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070927>
- Obaeda B.M. Yeast as a source of single cell protein production: a review // Plant Arch. 2021. V. 21. Sppl. 1. P. 324–328. <https://doi.org/10.51470/PLANTARCHIVES.2021.v21.S1.051>
- Onuma Y., Satake M., Ukena T. et al. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism // Toxicol. 1999. V. 37 (1). P. 55–65. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00133-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00133-0)
- Prester L. Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review // Food Addit. Contam. 2011. V. 28 (11). P. 1547–1560. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.600728>
- Prester L., Macan J., Varnai V.M. et al. Endotoxin and biogenic amine levels in Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*), sardine (*Sardina pilchardus*) and Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) stored at 22°C // Food. Addit. Contam. 2009. V. 26 (3). P. 355–362. <https://doi.org/10.1080/02652030802520878>
- Ramos V., Vasconcelos V. Palytoxin and analogs: biological and ecological effects // Mar. Drugs. 2010. V. 8 (7). P. 2021–2037. <https://doi.org/10.3390/md8072021>
- Rezaei M., Montazeri N., Langrudi H.E. et al. The biogenic amines and bacterial changes of farmed rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) stored in ice // Food Chem. 2007. V. 103 (1). P. 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.066>
- Rodjuk G.N., Chukalova N.N., Shenderyuk et al. Prevalence of skin ulceration in cod (*Gadus morhua callarias* L.) under anthropogenic contamination in the southeastern part of the Baltic Sea // Inland Wat. Biol. 2012. V. 5. P. 133–139. <https://doi.org/10.1134/S1995082912010129>
- Sato S., Kodama M., Ogata T. et al. Saxitoxin as a toxic principle of a freshwater puffer, *Tetraodon fangi*, in Thailand // Toxicol. 1997. V. 35 (1). P. 137–140. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00003-7)
- Shelephchikov A.A., Shenderyuk V.V., Brodsky E.S. et al. Contamination of Russian Baltic fish by polychlorinated

- dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like biphenyls // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2008. V. 25 (2). P. 136–143.
- Shipp E.B., Restum J.C., Giesy J.P. et al. Multigenerational study of the effects of consumption of PCB-contaminated carp from Saginaw Bay, Lake Huron, on mink. 2. Liver PCB concentration and induction of hepatic cytochrome P-450 activity as a potential biomarker for PCB exposure // *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 1998. V. 54 (5). P. 377–401.  
https://doi.org/10.1080/009841098158809
- Smith E.A., Grant F., Ferguson C.M., Gallacher S. Biotransformations of paralytic shellfish toxins by bacteria isolated from bivalve molluscs // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67 (5). P. 2345–2353. https://doi.org/. 2001.  
https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2345-2353
- Solter P.F., Beasley V.R. Safety assessment including current and emerging issues in toxicologic pathology // *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology.* Cambridge: Acad. Press, 2013. V. II. P. 1155–1186.
- Ugalde U.O., Castrillo J.I. Single cell proteins from fungi and yeasts // *Applied mycology and biotechnology.* V. 2. Agriculture and food production / Eds G.G. Khachatourians, D.K. Arora. Amsterdam: Elsevier, 2002. P. 123–149.  
https://doi.org/10.1016/S1874-5334(02)80008-9
- van den Berg M., Birnbaum L.S., Denison M. et al. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds // *Toxicol. Sci.* 2006. V. 93 (2). P. 223–241.  
https://doi.org/10.1093/toxsci/kf1055
- Wang W., Evans R.D., Hickie B.E. et al. Methylmercury accumulation and elimination in mink (*Neovison vison*) hair and blood: results of a controlled feeding experiment using stable isotope tracers // *Environ. Toxicol. Chem.* 2014. V. 32 (12). P. 2873–2880.  
https://doi.org/10.1002/etc.2762
- Wannemacher R.W. Jr., Bunner D.L., Neufeld H.A. Toxicity of trichothecenes and other related mycotoxins in laboratory animals // *Mycotoxins and animal foods* / Eds J.E. Smith, R.S. Henderson. Boca Raton: CRC Press, 1991. P. 499–552.
- Wauters G., Avesani V., Charlier J. et al. Histidine decarboxylase in Enterobacteriaceae revisited // *J. Clin. Microbiol.* 2004. V. 42 (12). P. 5923–5924.  
https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5923-5924.2004
- Wiese M., D'Agostino P.M., Mihali T.K. et al. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs // *Mar. Drugs.* 2010. V. 8 (7). P. 2185–2211.  
https://doi.org/10.3390/md8072185
- Wu W., Zhou H.R., Bursian S.J. et al. Comparison of anorectic and emetic potencies of deoxynivalenol (vomitoxin) to the plant metabolite deoxynivalenol-3-glucoside and synthetic deoxynivalenol derivatives EN139528 and EN139544 // *Toxicol. Sci.* 2014. V. 142 (1). P. 167–181.  
https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu186

## Toxic Substances and Their Sources in Feed for Fur-Bearing Animals

S. V. Beketov<sup>a,\*</sup>, I. V. Bogomolova<sup>b</sup>, M. N. Praded<sup>c</sup>, I. V. Toporova<sup>b</sup>, L. V. Toporova<sup>b</sup>, and A. P. Kaledin<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>b</sup>Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – Moscow Skryabin Veterinary Academy, Moscow, Russia

<sup>c</sup>International Medicinal Leech Center, Udelnaya, Moscow region, Russia

<sup>d</sup>Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

\*e-mail: svbeketov@gmail.com

The use of a wide variety of animal and plant feeds in fur farming, a significant number of suppliers, as well as the complexity of transportation and storage of feed raw materials increase the risks of feed toxicoinfections and toxicoses. The proposed review article describes in detail the main toxic substances and their sources in fur-bearing animal feed, including biological and chemical toxins, namely bacterial and fungal metabolites, protein breakdown products and fat oxidation, fish biotoxins, heavy metals, persistent organochlorine compounds, pesticides, etc.

**Keywords:** fur farming, feed toxins, toxicoinfections, toxicoses

УДК 568.14:568.15:568.16:568.17:568.18:568.19:568.2:569:575.8:612.55

## ПРЕАДАПТИВНОСТЬ НЕСОКРАТИТЕЛЬНОГО ТЕРМОГЕНЕЗА В ЭВОЛЮЦИИ ТЕПЛОКРОВНОСТИ У ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2023 г. В. А. Черлин\*

*Дагестанский государственный университет, Махачкала, Республика Дагестан, Россия*

*\*e-mail: cherlin51@mail.ru*

Поступила в редакцию 04.03.2023 г.

После доработки 19.04.2023 г.

Принята к публикации 19.04.2023 г.

Большая часть тепла, которая выделяется в организме позвоночных, производится в мышцах при сократительном (во время движения или дрожания) и несократительном (без мышечной активности) термогенезе. Сократительный термогенез характерен для всех позвоночных, но он не способен постоянно поддерживать у животных высокую температуру тела. Основная идея, рассмотренная в данной статье и базирующаяся на уже большом количестве публикаций последних лет: главная биохимическая база теплокровности у позвоночных — часть цикла сокращения—расслабления попеременнополосатой скелетной мускулатуры, в котором акт сокращения мышц тем или иным образом выпадает, а энергия, которая должна была быть на это затрачена, рассеивается в виде теплоты. Этот несократительный термогенез, который способен поддерживать региональную и общую эндотермию позвоночных, и можно считать реальной биохимической основой теплокровности. Таким образом, наличие скелетной мускулатуры у всех позвоночных и общие биохимические основы цикла сокращения—расслабления представляют собой единое преадаптивное свойство проявления несократительного термогенеза у всех позвоночных, начиная с рыб, что является базой для эволюции теплокровности. Поэтому вполне объяснимы и неувидительны современные данные о том, что первые наземные позвоночные, скорее всего, были животными с высокими уровнями и метаболизма, и температуры тела.

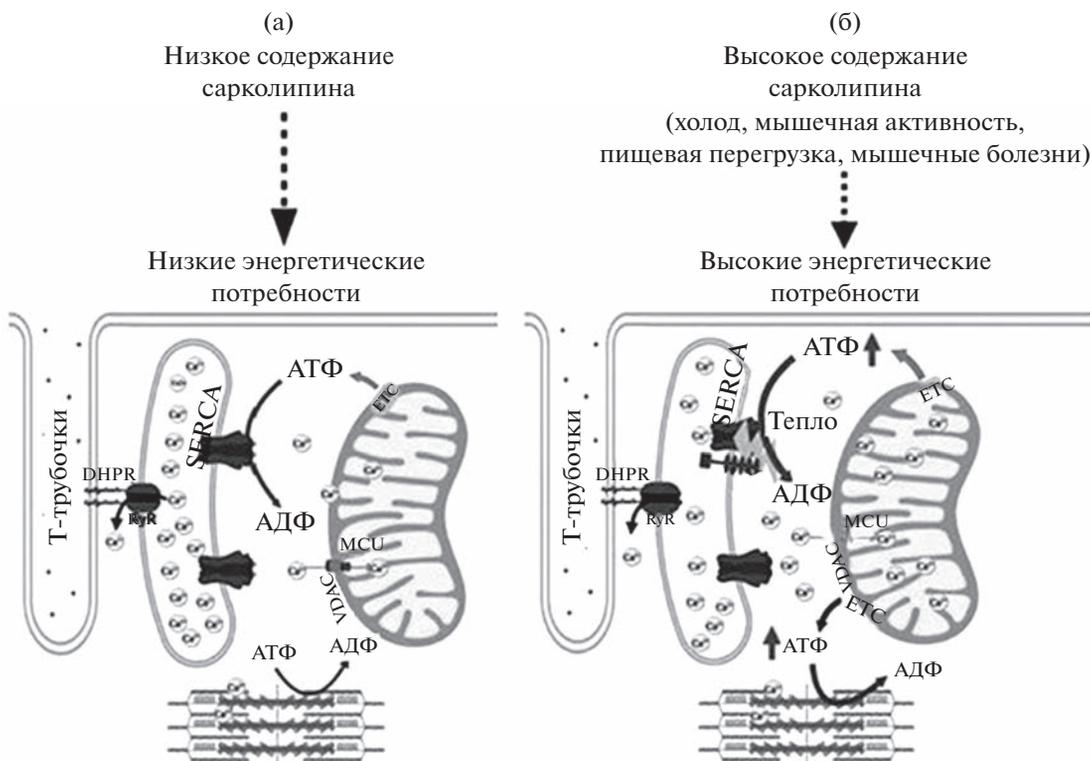
*Ключевые слова:* биохимия несократительного термогенеза, теплокровность, эволюция теплокровности

**DOI:** 10.31857/S004213242304004X, **EDN:** RZALFO

### ВВЕДЕНИЕ

Большинство биологов, обсуждая проблему теплокровности у позвоночных, имеют в виду следующую схему: выход на сушу первых тетрапод → адаптивные изменения, связанные с освоением новой воздушной среды обитания → развитие амниот → отбор на улучшение качества активности и связанное с этим морфофизиологическое переустройство → постепенное усиление основного обмена, развитие термометаболизма, повышение температуры тела и ее стабилизация → морфофизиологическая эволюция, направленная на стабилизацию тахиметаболизма и становление теплокровности. Но за последние годы в научной литературе появилось много важных публикаций, основанных на совершенно новых методах исследований, которые рассматривают биохимические и физиологические аспекты и механизмы термогенеза, принципы и направленности процесса эволюции у позвоночных. И в этой связи сам процесс появления и эволюции теплокровности видится теперь в несколько ином ракурсе: начиналось все, видимо, очень давно — еще до разделения на зауропсид и синапсид — с ароморфного резкого возрас-

тания митохондриального окисления, становления биохимического механизма несократительного термогенеза; в результате произошло повышение общего обмена, термометаболизма, температуры тела; далее постепенно происходили соответствующие морфофизиологические изменения, позволившие животным с новыми характеристиками вести успешную жизнедеятельность, выйти на сушу, то есть происходило постепенное становление морфологии и физиологии теплокровных животных. Таким образом, появление биохимической основы тахиметаболизма и повышенной температуры тела представляется, скорее, не конечным этапом развития и становления теплокровности, а началом этого процесса. Другими словами, сначала появляются биохимические и физиологические основы несократительного термогенеза как базы для теплокровности, затем на основании несократительного термогенеза проявляются фактические мезо- или тахиметаболизм и повышенная температура тела, а потом формируется морфофизиологическая структура теплокровных животных. Именно эта идея рассматривается в данной статье.



**Рис. 1.** Влияние уровней сарколипина на окислительный метаболизм в скелетных мышцах (по: Bal et al., 2021, с изменениями). Больше количество сарколипина увеличивает интенсивность окислительного метаболизма в мышцах. Насос  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума – SERCA – связывает гидролиз АТФ с транспортом  $\text{Ca}^{2+}$  (1 АТФ = 2  $\text{Ca}^{2+}$ ), но эта связь изменяется при взаимодействии сарколипина (SLN) и SERCA. Когда сарколипина мало или он совсем отсутствует (а), эффективность SERCA выше, и АТФ не тратится впустую, что приводит к снижению расхода энергии. Когда сарколипина много (б), он отсоединяет SERCA от транспорта  $\text{Ca}^{2+}$ , вызывая холостой цикл SERCA и большее количество гидролизуемого АТФ, тем самым увеличивая потребность в энергии. В то же время расцепление SERCA с помощью сарколипина приводит к повышению уровней цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  и АДФ, которые являются сильными активаторами синтеза митохондриального АТФ, тем самым помогая удовлетворить возросшую метаболическую потребность. Повышенная активность сарколипина играет важную роль в адаптации мышц к высоким потребностям/расходам энергии, в частности термогенезу, вызванному холодом, потребностями пищеварения и мышечной активностью, требующей выносливости, которые зависят от митохондриального окислительного метаболизма. MCU – митохондриальный унипорт (один из способов транспорта иона как пассивно, так и активно; во время унипорта происходит транспорт иона в одном направлении по градиенту концентрации). ETC (electron transport chain) – цепь переноса электронов; VDAC – анионный канал, зависящий от напряжения; RyR – риаинодиновые рецепторы; DHPR – дигидропиридиновый рецептор.

## БИОХИМИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ТЕРМОГЕНЕЗА У ПОЗВОНОЧНЫХ

*Как в организме образуется большая часть теплоты?*

В процессах сокращения и расслабления мышц и в направленном процессе производства тепла – термогенезе, который осуществляется в основном тоже в мышцах, огромную роль играет саркоплазматический ретикулум – мембранная органелла мышечных клеток, которая представляет собой сеть трубочек, тянущуюся по всем мышечным клеткам и обвивающуюся вокруг миофибрилл (сократительных единиц клеток). Мышечные клетки поперечнополосатой сердечной и скелетной мускулатуры содержат структуры – Т-трубочки – впячивания клеточной мембраны, тянущиеся к

центру клетки (рис. 1). Т-трубочки тесно связаны с особыми элементами саркоплазматического ретикулума. Это: терминальные цистерны – в случае сердечной мышцы или соединительный саркоплазматический ретикулум (junctional SR) – в случае скелетной мускулатуры.

Высвобождение кальция из саркоплазматического ретикулума происходит через риаинодиновые рецепторы (RyR, рис. 1) в соединительных терминальных цистернах (в сердце) и в соединительном саркоплазматическом ретикулуме (в скелетных мышцах). Механизм действия этих рецепторов до сих пор изучен слабо.

Во время цикла сокращения–расслабления используется SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) – насос из  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой

АТФазы, посредством которого энергия, высвобождающаяся при гидролизе АТФ, расходуется на транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  против градиента концентрации. В одном случае SERCA использует АТФ для перекачки  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля в саркоплазматический ретикулум, вызывая уменьшение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме и расслабление мышц (рис. 2а). В другом случае  $\text{Ca}^{2+}$  покидает саркоплазматический ретикулум через каналы рианодиновых рецепторов, вызывая увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме и сокращение мышц (рис. 2б).

Механизм мышечного несократительного термогенеза у амниотических животных так же, как и цикл расслабления—сокращения, связан с перемещением  $\text{Ca}^{2+}$  против градиента концентрации из цитоплазмы в эндоплазматический ретикулум (рис. 2в). Это перемещение производится благодаря активной работе SERCA, что требует затраты энергии. Она получается при гидролизе АТФ, в результате чего АТФ преобразуется в АДФ. Но если энергия, высвободившаяся при гидролизе, не тратится на перемещение  $\text{Ca}^{2+}$  против градиента его концентрации (когда механизм переноса энергии для этого заблокирован, например, сарколипном), то энергия рассеивается в виде тепла. Этому процессу способствуют и разобщающие белки — белки внутренней мембраны митохондрий, которые пропускают через себя протоны без синтеза АТФ. В результате энергия, не израсходованная на создание протонного градиента, преобразуется в тепло, которое рассеивается (рис. 1, 2). При этом у разных групп животных механизмы выработки тепла могут несколько различаться:

— у млекопитающих и птиц тепло в основном выделяется, когда сарколипин приводит к разединению активности SERCA и транспорта  $\text{Ca}^{2+}$ ;

— у рыб тепло вырабатывается за счет холостого цикла  $\text{Ca}^{2+}$  (Block, 1994; Morrissette et al., 2003; Da Costa, Landeira-Fernandez, 2009).

Оба процесса происходят в мышцах (Legendre, Davance, 2020; Grigg et al., 2022).

Итак, важнейший вывод из сказанного выше заключается в том, что часть биохимического цикла сокращения—расслабления мышц используется организмом, кроме прямого назначения, также и для производства тепловой энергии. Модификация процесса работы мышц становится биохимической базой не только для сократительного, но и для несократительного термогенеза, являясь основной, преадаптацией для последующего появления и развития эндогенного термогенеза.

*В чем состоит основное отличие теплокровности от холоднокровности?*

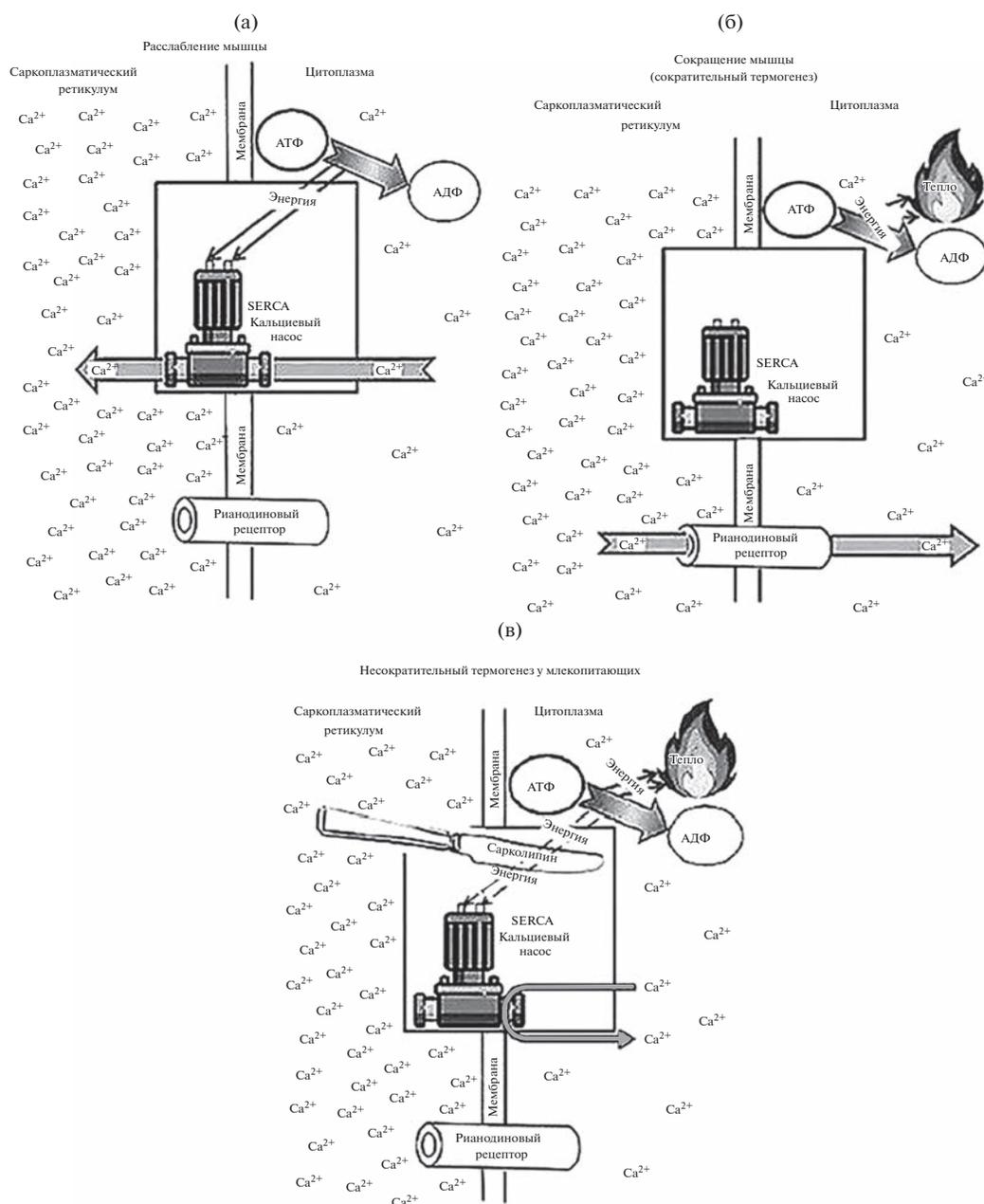
Все позвоночные обладают мышечной системой, которая при своей деятельности выделяет больше

или меньше теплоты. Теплота выделяется и в режиме сокращения, и в несократительном варианте.

Экотермные, брадиметаболические, холоднокровные животные вырабатывают тепло при сокращении мышц, но чаще всего количество этой теплоты сравнительно невелико, оно не способно существенно поднять температуру тела и тем более удерживать ее в течение длительного времени на высоком уровне. Особенно это характерно для мелких животных. Хотя известны случаи региональной эндотермии, когда интенсивно работающие мышцы поднимают температуру тканей в основном в той области, где они сами находятся. Например, такой региональной эндотермией (с сократительной основой) обладают активно двигающиеся рыбы — акулы, скумбриевые, тунцы и др., у которых повышается прежде всего температура красных аэробных мышц, расположенных вокруг позвоночника. Когда по каким-то причинам такие рыбы перестают постоянно двигаться, температура этих участков тела у них опускается до температуры окружающей воды. Также температура регионально повышается у морских черепах при постоянных движениях их лап-ласт, при этом повышается даже температура всего их тела. Но это примеры поднятия температуры тела за счет сократительного термогенеза. При этом несмотря на то, что теплота вырабатывается у них в мышцах, то есть внутри тела, они все равно остаются холоднокровными, поскольку без двигательной активности они не способны поднять и удерживать на достаточно высоком уровне температуру своего тела. Это холоднокровные животные с региональной эндотермией.

Эндотермные, мезо- или тахиметаболические, теплокровные животные вырабатывают основную часть теплоты тоже в мышцах, но отличие их заключается в том, что используется для этого в основном несократительный термогенез. Существенное отличие от экотермных животных связано с тем, что в таком варианте они способны без всякой двигательной сократительной активности в спокойном состоянии вырабатывать эндогенное тепло, поднимая таким образом и постоянно поддерживая температуру тела на достаточно высоком уровне — обычно выше 28–30°C. Это реальные, настоящие эндотермные животные.

Другими словами, истинная эндотермия имеет в своей биохимической базе несократительный термогенез. При этом у истинных эндотермов, естественно, не исключается выработка тепла также и за счет сократительного термогенеза, а какая-то часть теплоты (обычно очень незначительная или в течение короткого времени) у экотермных животных может вырабатываться несократительным путем. То есть можно констатировать: поскольку у всех позвоночных имеется скелетная мускулатура, это автоматически означает и то, что у всех позво-



**Рис. 2.** Упрощенное схематическое изображения процессов, происходящих в мышцах позвоночных животных при их расслаблении и сокращении, при несократительном термогенезе, а также механизм выделения при этом теплоты. (а) Расслабление мышц. В саркоплазматическом ретикулуме  $\text{Ca}^{2+}$  всегда больше, чем в цитоплазме клетки.  $\text{Ca}^{2+}$  стимулируют сокращение мышцы. Уменьшение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клетки и, следовательно, их доступности для миофибрилл, вызывает расслабление мышцы. Серой стрелкой, проходящей через насос SERCA, указано направление движения  $\text{Ca}^{2+}$ . Кальциевый насос использует энергию, высвобождающуюся при гидролизе АТФ, для перекачки  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля в саркоплазматический ретикулум против градиента концентрации. (б) Сокращение мышц.  $\text{Ca}^{2+}$  покидает саркоплазматический ретикулум через каналы рианодиновых рецепторов. При этом происходит увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клетки и их доступности для миофибрилл, что вызывает сокращение мышц. Серой стрелкой, проходящей через рианодиновый рецептор, указано направление движения  $\text{Ca}^{2+}$ . Часть энергии, получаемой при гидролизе АТФ, используется на сам акт сокращения мышц, а часть — высвобождается в виде тепла. (в) Несократительный термогенез. У млекопитающих переход к несократительному термогенезу вызван присоединением к SERCA белка сарколипина. Это усиливает гидролиз АТФ, а  $\text{Ca}^{2+}$  присоединяются к SERCA. Но вместо того, чтобы транспортироваться в саркоплазматический ретикулум, они снова высвобождаются на цитозольной стороне, производя тепло от гидролиза АТФ без фактического сокращения мышц. Серой стрелкой, возвращающейся через входную часть насоса SERCA, указано направление движения  $\text{Ca}^{2+}$  при несократительном термогенезе.

ночных есть биохимические предпосылки, преадаптации к проявлению несократительного термогенеза. А значит, эти проявления можно ожидать у всех групп позвоночных, начиная с рыб.

### ПРОЯВЛЕНИЯ НЕСОКРАТИТЕЛЬНОГО ТЕРМОГЕНЕЗА СРЕДИ СОВРЕМЕННЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ

#### *Термогенез у рыб*

У некоторых групп активно двигающихся крупных рыб зарегистрирована существенная теплопродукция, связанная с сократительным термогенезом. Так, тунцы *Thunnini* и некоторые акулы *Lamnidae* используют противоток крови для сохранения побочного тепла в боковой плавательной мускулатуре (Carey, Teal, 1966, 1969; Bernal et al., 2005; Sepulveda et al., 2007, 2008; Ciezarek et al., 2019) вследствие их высокой подвижности и дальности миграции (Watanabe et al., 2015). Неизвестно, дополняется ли это выработкой тепла на основе SERCA, но, в отличие от типичных эктотермов, известно, что скорость метаболизма тихоокеанского голубого тунца *Thunnus orientalis* увеличивается в более прохладной воде (Blank et al., 2007), что указывает на возможный термогенез в ответ на холод (Ciezarek et al., 2019). Стоит отметить, что у некоторых тунцов также имеются обширные висцеральные сосудистые сети (Stevens, 2011).

Приведенные выше данные говорят о наличии у рыб сократительного термогенеза. Но, кроме того, доказано и наличие у них отдельных проявлений несократительного термогенеза. Так, показано, что опухи *Lampris* sp. поддерживают температуру большей части своего тела на несколько градусов выше уровня температуры морской воды (Runcie et al., 2009; Wegner et al., 2015; Davesne et al., 2018). У них глазодвигательные мышцы теряют способность к сокращениям, но в них при этом выделяется тепло (несократительный термогенез). Также тепло вырабатывается у опухов и мышцами, приводящими в движение грудные плавники (сократительный термогенез). При этом противоточное расположение сосудов в жабрах способствует сохранению тепла в теле. В результате при температуре воды около 11°C, температура разных частей тела опухов колеблется в диапазоне от 13 до 17°C, причем наивысшая температура отмечена именно в районе глаз: если несократительный термогенез в глазодвигательных мышцах способен повышать локальную температуру на 6°C относительно остального тела, то сократительный термогенез в мышцах грудных плавников – всего на 3–4°C (Wegner et al., 2015).

У рыб тепло вырабатывается за счет холостого цикла  $Ca^{2+}$ : каналы рианодиновых рецепторов высвобождают  $Ca^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума, а SERCA (фактически та же изоформа,

что участвует в мышечном несократительном термогенезе у млекопитающих) перекачивает его обратно в органеллу, что приводит к увеличению выработки тепла за счет повышения активности (Block, 1994; Morrissette et al., 2003; Da Costa, Landeira-Fernandez, 2009). Неизвестно, задействован ли при этом сарколипин или другой разобщитель. Хотя недавно была предложена идея о том, что судить о степени участия сарколипина в процессах, происходящих в глубоких мышечных тканях, можно по соотношению сарколипина/SERCA (Franck et al., 2019).

Тем не менее, теплопродукция у рыб есть, она локализована внутри мышц и не приводит к тахиметаболической эндотермии (теплокровности), в результате чего рыбы остаются брадиметаболическими эктотермами (холоднокровными).

#### *Термогенез у амфибий и современных рептилий*

Фактов проявления термогенеза у амфибий до сих пор, практически, не существует (De Andrade, 2016). Хотя для некоторых видов жаб, живущих в пустынях, известно повышение температуры тела за счет внешнего тепла путем поведенческой регуляции (как у рептилий) порой до 39°C (Pearson, Bradford, 1976). Но это возможно исключительно для земноводных с сухой кожей, у которых дыхательная функция кожи ослаблена. Для лягушек с влажной кожей повышение уровня температуры тела и внутреннего термогенеза опасно, поскольку это приведет к высушиванию кожи и резкому ослаблению или потере ею функции дыхания.

Но еще в конце XIX–начале XX вв. ученые исследовали уровень метаболизма некоторых холоднокровных животных, в том числе и амфибий. Пример результатов такого исследования приведен в табл. 1.

Данные об уровне основного обмена у ряда видов амфибий приведены в табл. 2. Вообще, амфибии – животные малоподвижные, поэтому сократительный термогенез у них никакого серьезного влияния на температуру тела не оказывает, хотя, как мы уже говорили, у активно двигающихся рыб красные аэробные мышцы значительно нагреваются и могут увеличивать температуру тела, правда, в основном локально (Черлин, 2021a; Legendre, Davesne, 2020).

С рептилиями не все так однозначно. Их метаболизм намного выше, чем у амфибий, но существенно ниже, чем у млекопитающих. Также невелика у них и теплопродукция (табл. 2, 3). При этом важно учесть, что сейчас мы рассматриваем биологические особенности лишь современных рептилий. Это важно, поскольку огромное количество вымерших групп рептилий имели совсем другие физиологические характеристики, и о них в нашей статье речь пойдет далее.

**Таблица 1.** Уровень метаболизма у некоторых видов амфибий и рептилий в зависимости от температуры – выделение CO<sub>2</sub>, мг на 1 кг веса в час (по: Vernon, 1897; Tigerstedt, 1910)

Виды	Температура, °С										
	2	6	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25	27.5	30
Амбистома <i>Ambystoma tigrinum</i>	72	85	106	122	129	147	150	201	242	249	313
Обыкновенный тритон <i>Molge vulgaris</i> (совр. <i>Lissotriton vulgaris</i> )	108	126	181	178	172	212	193	224	269	387	462
Веретеница ломкая <i>Anguis fragilis</i>	17	28	41	29	51	63	63	116	137	165	198
Жаба серая <i>Bufo vulgaris</i>	76	69	131	127	138	132	174	203	292	623	719
Лягушка травяная <i>Rana temporaria</i>	62	71	80	97	101	110	139	165	196	284	518
Лягушка прудовая <i>Rana esculenta</i> (совр. <i>Pelophylax lessonae</i> )	25	50	68	85	100	96	110	134	152	152	186

**Таблица 2.** Основной обмен у разных групп позвоночных животных

Животные	<i>P</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	Источник
Амфибии				
Амбистома <i>Ambystoma tigrinum</i>	13.4	0.075	14	Проссер, 1977
Лягушка крикетная <i>Acris</i> (апрель) (май)	150	0.035 0.100	15 15	Dunlap, 1969
Лягушка <i>Rana</i>	32	0.055	15	Проссер, 1977
Жаба <i>Bufo</i>	61	0.052	15	Проссер, 1977
Рептилии				
Ящерицы				Проссер, 1977
Сцинк <i>Lygosoma</i>	1.5	0.295	30	Hudson, Bertram, 1966
Ошейниковая игуана <i>Crotaphytus</i>	30	0.200	30	Dawson, Templeton, 1966
Аллигаторовая ящерица <i>Gerrhonotus</i>	30	0.298	35	Hudson, Bertram, 1966
Бородатая агама <i>Amphibolurus</i>	373	0.140	28	Проссер, 1977
Такырная круглоголовка <i>Phrynocephalus helioscopus</i>	6	0.616 0.575	35 40	Четанов и др., 2014
Круглоголовка-вертихвостка <i>Phrynocephalus guttatus</i>	6	0.661 0.859	30 40	Четанов и др., 2014
Змеи				
Южноамериканский удав <i>Epicrates cenchria</i>	3270	0.018	20	Galvao et al., 1965
Желтая анаконда <i>Eunectes notaeus</i>	11 300	0.021	20	Проссер, 1977
Обыкновенный уж <i>Natrix natrix</i>	84	0.070	16	Проссер, 1977
Крокодилы				
Аллигатор <i>Alligator mississippiensis</i>	49000	0.079	28	Проссер, 1977
Черепahi				
Расписная черепаха <i>Chrysemys picta</i>	100–300	0.031	18	Проссер, 1977

Примечание: *P* – вес тела, г; *C* – потребление O<sub>2</sub>, мг/(г×ч); *T* – температура окружающей среды и тела, °С.

Способность повышать температуру тела за счет сократительного термогенеза отмечена в разных ситуациях у рептилий в основном средних и крупных размеров – питонов, игуан, варанов, черепах и крокодилов (Орлов, 1986; Benedict, 1932; Galvao et al., 1965; Hutchison et al., 1966; Brattstrom, Collins, 1972; Fair et al., 1972; Cloudsley-Thompson, 1974; Johnson, 1974; Dutton, Fitzpatrick, 1975; Smith, 1975; Sapsford, Hughes, 1978; Bartholomew, 1982; Standora et al., 1982; Seebacher et al., 1999; Burness et al., 2001; Legendre, Davence, 2020).

Так, у кожистой морской черепахи *Dermochelys coriacea*, самой большой из современных видов черепах, описана гомеотермия – ее способность поддерживать температуру тела на относительно постоянном уровне – около 25°C (Greer et al., 1973), что может быть на 10–18°C выше температуры окружающей воды, даже во время активного плавания и глубоких погружений в приполярных регионах при температуре воды меньше 5°C (Bostrom et al., 2010; Kohler et al., 2012). Эта ситуация обеспечивается у них несколькими факторами: 1) местное повышение температуры вследствие сократительного термогенеза при движении лап; 2) толстый изолирующий слой обильно васкуляризированной жировой ткани, аналогичной жировой ткани китообразных и ластоногих (Davenport et al., 2009); 3) такая гомеотермия – проявление гигантотермии, связанной с большими размерами тела, что позволяет сохранять тепло без повышения скорости метаболизма (Paladino et al., 1990); 4) в передних и задних лапах у черепах имеются противоточные теплообменники (чудесная сеть) (Greer et al., 1973), которые ограничивают рассеивание тепла (Bostrom et al., 2010; Davenport et al., 2015), сохраняя его в теле. Но, кроме того, у кожистых черепах описано повышение скорости метаболизма при плавании в холодных водах примерно в 3 раза (De Andrade, 2016), что может свидетельствовать об адаптивном несократительном термогенезе.

Также описан дрожательный (сократительный) термогенез у некоторых видов змей в период насиживания кладки. Например, самки питонов плотно обвивают кладку кольцами своего тела, температура которого при этом повышается и стабилизируется на уровне примерно 30–32°C.

Происходит это двумя основными путями. Один из них – терморегуляционное поведение. Если температура окружающей среды и тела самки питона опускается ниже 31°C, змея перемещает часть своего тела в нагретую зону под источник тепла (под лампу), греет ее, а затем втягивает эту нагретую часть внутрь колец туловища поближе к кладке. В результате температура всего тела и кладки питона повышается (Орлов, 1986; Valensiennes, 1841; Lamarre-Picquot, 1842; Hutchison et al., 1966; Crawshaw et al., 1981; Harlow, Grigg, 1984; Slip,

**Таблица 3.** Выделение теплоты за сутки (по: Трошин, Трошина, 1978)

Животные	Выделение тепла, Дж/кг
Гремучая змея	32.3
Сурок	80.5
Кролик	188.2

Shine, 1988). Такое поведение наблюдается, например, у королевского питона *Python regius*, тиморского водяного питона *Liasis mackloti* и зеленого питона *Chondropython viridis* (Орлов, 1986). Но есть и второй путь. При температуре субстрата и воздуха ниже 25.5–31°C у самок питонов наблюдаются пульсирующие сокращения мышц тела с частотой 10–42/мин. При этом температура тела змей повышается до 32–33°C и поддерживается на этом уровне (Орлов, 1986). Это типичный пример дрожательного или сократительного термогенеза. При этом показано, что частота мышечных контрактур прямо пропорциональна эндогенному повышению температуры тела (van Mierop, Barnard, 1976a, 1976b). В результате дрожательный термогенез поднимает температуру тела относительно температуры воздуха на 7–18°C (Орлов, 1986; Slip, Shine, 1988; Snow et al., 2010), что отмечено у бирманского питона *Python bivittatus* (Valensiennes, 1841; Lamarre-Picquot, 1842; Hutchison et al., 1966), у коврового питона *Morelia spilota* (Slip, Shine, 1988; Stahlschmidt, DeNardo, 2009), у королевского питона, тиморского водяного питона и зеленого питона (Орлов, 1986).

При этом проявление способности к эндогенному повышению температуры тела отмечено у беременных самок питонов примерно за 2 нед. до яйцекладки. Весь период инкубации яиц длится 68–70 дней. Почти все это время температура тела змей повышена, но за 5–10 дней до конца инкубации температура их тела постепенно понижается и сравнивается с температурами субстрата и воздуха (Орлов, 1986). Вполне допустимо предположить, что в данном случае для повышения температуры тела используется не только сократительный термогенез, но и несократительный (Legendre, Davence, 2020). Однако, к сожалению, биохимический механизм возможного несократительного термогенеза у рептилий пока не изучался.

Способность повышать температуру тела вне связи с родительским поведением описана и для других рептилий, особенно средних и крупных размеров – игуан, варанов, а при строительстве гнезда – у черепах и крокодилов (Benedict, 1932; Hutchison et al., 1966; Brattstrom, Collins, 1972; Cloudsley-Thompson, 1974; Johnson, 1974; Dutton, Fitzpatrick, 1975; Smith, 1975; Sapsford, Hughes, 1978; Bartholomew, 1982). Если у мелких рептилий с большой относительной поверхностью тела эн-

догенное тепло очень быстро рассеивается, то у более крупных животных оно может иметь определенное значение (Benedict, 1932). Это показано на крупных черепахах, варанах и др. (Galvao et al., 1965; Fair et al., 1972; Seebacher et al., 1999; Burness et al., 2001), на кожистых морских черепахах *Dermochelys coriacea* (Fair et al., 1972), на зеленых черепахах *Chelonia mydas* (Standora et al., 1982).

Кроме того, у некоторых видов змей, например каскавеллы *Crotalus durissus*, при переваривании пищи отмечено заметное повышение уровня метаболизма и температуры тела (Benedict, 1932; Tattersall et al., 2004).

Продемонстрировано также проявление несократительного термогенеза у аргентинского черно-белого тегу *Salvator (Tupinambis) merianae* в течение репродуктивного сезона. Днем они много греются (Huey, 1982; Tattersall et al., 2016). Но чтобы сократить время утреннего нагревания крупной ящерицы весом до 4 кг до необходимой температуры тела 35–37°C (Sanders et al., 2015), им выгодно перед началом утренней активности предварительно поднять на несколько градусов температуру тела (Huey, Slatkin, 1976). Снижения частоты сердечных сокращений и периферического кровотока, характерного для этих животных (De Andrade et al., 2004), недостаточно, чтобы поддерживать высокую температуру тела в течение ночи. Зато тегу могут утром поднимать температуру тела примерно на 6°C выше температуры окружающей среды, даже если у них нет источников внешнего тепла в течение нескольких дней (De Andrade, 2016; Tattersall et al., 2016).

В разных ситуациях описаны также и другие случаи отчетливо проявляющегося, хотя не слишком эффективного, несократительного термогенеза у разных видов ящериц, змей и черепах (Engbretson, Livezey, 1972; Tattersall et al., 2004, 2016; Tattersall, 2016).

Таким образом, современные рептилии несмотря на то, что они считаются холоднокровными, эктотермными животными, обладают способностью не только к сократительному, но и к несократительному эндогенному термогенезу, который, скорее, по биохимическому механизму сродни теплопродукции птиц и млекопитающих.

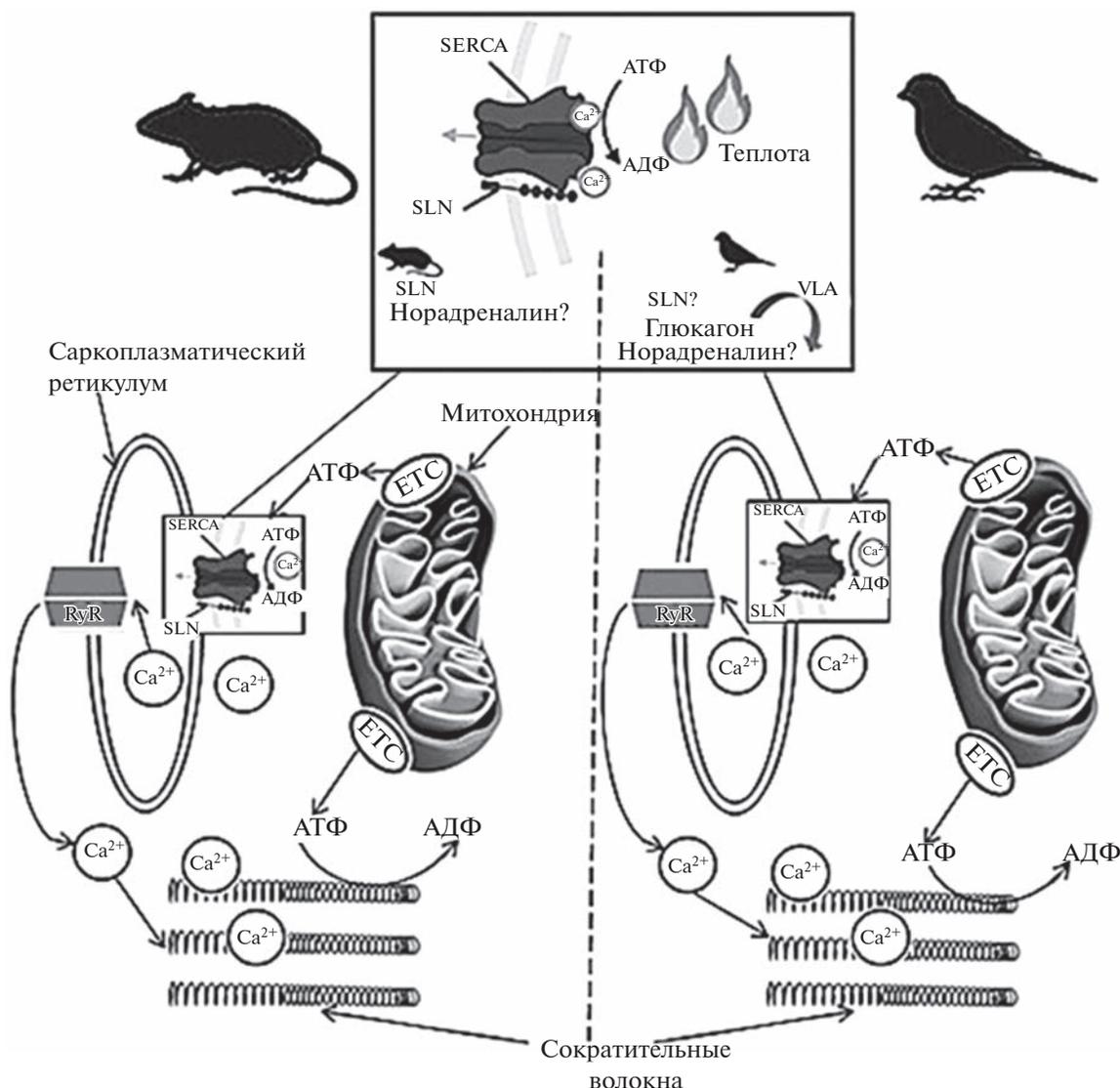
#### Термогенез у млекопитающих

В термогенезе млекопитающих ведущую роль играет SERCA, то есть кальциевый насос, участвующий в цикле сокращения–расслабления мышц, разобщенный сарколипинам от транспорта кальция при выработке тепла. Когда SERCA функционирует в термогенезе млекопитающих, его активность увеличивается за счет сарколипина (рис. 3). Сарколипин способствует тому, что  $Ca^{2+}$  присоединяется к SERCA, но вместо транспорта в саркоплазматический ретикулум он снова выво-

бодается на цитозольной стороне (Smith et al., 2002; Bal et al., 2012). Таким образом, тепло вырабатывается без сокращения мышц.

Исследования, проведенные несколькими различными группами ученых, доказали роль сарколипина в термогенезе и мышечном метаболизме (Maurya et al., 2018; Rotter et al., 2018; Kaspari et al., 2020; Nicolaisen et al., 2020; Wang et al., 2020). Кроме того, недавняя экспериментальная работа на поросятах дикого кабана *Sus scrofa* — плацентарных млекопитающих, у которых отсутствует бурая жировая ткань — показала два важных обстоятельства (Nowack et al., 2019). Во-первых, несократительный термогенез происходит у них именно в мышцах. Во-вторых, в онтогенезе у диких поросят происходит замена сократительного термогенеза на несократительный, что сопровождается увеличением температуры тела и увеличением активности SERCA и сарколипина. Среди плацентарных млекопитающих мышечный несократительный термогенез до сих пор идентифицирован у грызунов, кроликов (Nowack et al., 2017) и диких кабанов (Nowack et al., 2019). Тем не менее, современные данные показывают, что несократительный термогенез, скорее всего, есть у всех млекопитающих либо как первичный механизм производства тепла, либо у многих плацентарных (особенно мелких) он присутствует в дополнение к механизму выработки тепла при помощи бурой жировой ткани (Rowland et al., 2015b; Nowack et al., 2017). Или, скорее, наоборот — выработка тепла при помощи бурой жировой ткани может быть в ряде случаев дополнением к первичному механизму термогенеза (мышечному несократительному термогенезу). Кроме того, активность сарколипина в скелетных мышцах грызунов повышается (то есть у них активизируется несократительный термогенез), или когда исследуемые животные адаптируются к холоду, или на последних стадиях согревания у животных, находившихся в спячке (Anderson, 2016; Pant et al., 2016; Bal et al., 2016, 2017; Nowack et al., 2019; Oliver et al., 2019).

Все эти данные показывают, что сарколипин очень важен для несократительного термогенеза мышц у грызунов, а еще сильнее у видов, лишенных бурой жировой ткани и UCP1 (uncoupling protein 1) (Nowack et al., 2019), у однопроходных и сумчатых (Hayward, Lisson, 1992; Rose et al., 1999; Kabat et al., 2003a, 2003b; Polymeropoulos et al., 2012) и у некоторых крупных видов (Saito et al., 2008; Gaudry et al., 2017). Следовательно, эндотермия у неплацентарных млекопитающих, как и у птиц, зависит от несократительного термогенеза мышц. Это дает возможность предположить, что первичный, древний источник несократительного термогенеза у всех млекопитающих действительно находился в скелетных мышцах и реализовался в них путем модификации активности SERCA (Bal et al., 2012, 2016; Rowland et al., 2015b; Nowack et al., 2017)



**Рис. 3.** Механизмы мышечного несократительного термогенеза у млекопитающих и птиц (по: Grigg et al., 2022, с изменениями). SLN – сарколипин, VLA - антиген (very late antigen), RyR – рианодиновые рецепторы, ETC – цепь транспорта электронов (electron transport chain). Области, заключенные в рамки, относятся к переходу к мышечному несократительному термогенезу у млекопитающих и птиц.  $Ca^{2+}$ -АТФаза (SERCA) саркоплазматического ретикулума представляет собой  $Ca^{2+}$ -насос, участвующий в мышечном сокращении и термогенезе. Во время цикла сокращения–расслабления (нестандартно) SERCA использует АТФ для перекачки  $Ca^{2+}$  из цитозоля в саркоплазматический ретикулум, что приводит к расслаблению мышц;  $Ca^{2+}$  покидают саркоплазматический ретикулум через каналы рианодиновых рецепторов (RyR), вызывая мышечное сокращение. У млекопитающих переход к несократительному термогенезу вызван присоединением белка сарколипина к SERCA, что увеличивает использование им АТФ благодаря “ускальзыванию”  $Ca^{2+}$ . Другими словами,  $Ca^{2+}$  присоединяется к SERCA, но вместо того, чтобы транспортироваться в саркоплазматический ретикулум, он снова высвобождается на цитозольной стороне, производя тепло от гидролиза АТФ, но фактического сокращения мышц при этом не происходит. Видимо, имеется сильное сходство между механизмами несократительного термогенеза мышц у птиц и млекопитающих, хотя физиологическая роль сарколипина и норэпинефрина в несократительном термогенезе мышц птиц активно изучается, но еще до конца не выяснена (Filali-Zegzouti et al., 2005). При этом особую роль в термогенезе играют разобщающие белки UCPs (uncoupling proteins) – белки внутренней мембраны митохондрий, которые пропускают через себя протоны без синтеза АТФ, чем способствуют преобразованию энергии, не израсходованной на создание протонного градиента, в тепло.

при существенной специфической роли сарколипина (Maurya et al., 2018; Rotter et al., 2018; Kaspari et al., 2020; Nicolaisen et al., 2020; Wang et al., 2020).

Считается общеизвестным, что несократительный термогенез у млекопитающих является исключительно результатом активности разобщающего белка UCP1, находящегося в местах скопле-

ния бурой жировой ткани (Cannon, Nedergaard, 2004). Некоторые авторы однозначно высказываются о несомненной связи термогенеза млекопитающих и бурой жировой ткани: “Нет других вариантов недрожательного термогенеза млекопитающих, кроме как происходящего от адренергической стимуляции бурой жировой ткани” (Cannon et al., 2000, p. 387).

Но бурая жировая ткань имеется далеко не у всех современных млекопитающих. Бурой жировой ткани и UCP1 нет у однопроходных и у сумчатых (Augee, 1978; Hayward, Lisson, 1992; Rose et al., 1999; Kabat et al., 2003a, 2003b; Polymeropoulos et al., 2012). Нет ее и у некоторых плацентарных млекопитающих (Rothwell, Stock, 1985; Gaudry et al., 2017; Nowack et al., 2019).

Бурая жировая ткань присутствует у многих, в основном у мелких плацентарных (Saito et al., 2008) и особенно у тех, у кого отмечается торпор и/или гибернация в очень холодном климате. Для них бурая жировая ткань может являться необходимостью как дополнительный энергетический ресурс (Nowack et al., 2017; Cannon et al., 2000).

Но несократительный термогенез в скелетных мышцах – также существенный (но не совершенно обязательный) источник тепла во время пробуждения от оцепенения или гибернации у сумчатых и однопроходных млекопитающих. Тем не менее отсутствие бурой жировой ткани и термогенного UCP1 у тахиметаболических эндотермов – однопроходных, сумчатых и многих плацентарных – не мешает их способности к несократительному термогенезу. Так, специальные исследования показали, что тахиметаболический термогенез у тасманийского короткомордого кенгуру беттонга *Bettongia gaimardi* и тасманского дьявола *Sarcophilus harrisii*, вероятно, происходит именно в скелетных мышцах (Ye et al., 1995, 1996; Rose et al., 1999; Kabat et al., 2003a, 2003b; Rowland et al., 2015a). Кроме того, появилось предположение, что бурая жировая ткань является для млекопитающих не основным источником теплоты и что “эволюционное появление бурой жировой ткани могло быть связано с потребностью в дополнительном термогенном механизме у молодых и более мелких млекопитающих” (Eldershaw et al., 1996, p. 315). Показано (Grigg et al., 1992), что при пробуждении от торпора крупной короткоклювой ехидны *Tachyglossus aculeatus*, выкопанной из природной зимней спячки, она успешно нагревалась от 12 до 35°C. Экспериментально продемонстрирована возможность млекопитающих разных групп согреваться после оцепенения и/или гибернации до нормальной температуры тела, несмотря на отсутствие у них бурой жировой ткани (Geiser, 1988; Grigg et al., 1989, 1992, 2004; Grigg, Beard, 2000; Grigg, 2004; Nicol, Andersen, 2008; Geiser, Körtner, 2010; Nicol, 2017).

Материалы, касающиеся бурой жировой ткани и механизмов термогенеза, связанных с ней (проявлений UCP1 в митохондриях), приведены во многих публикациях (Johnston, 1971; Rowlatt et al., 1971; Augee, 1978; Rothwell, Stock, 1985; Dawson, 1989; Saarela et al., 1991; Hayward, Lisson, 1992; Brigham, Trayhurn, 1994; Holloway, Geiser, 2001; Kabat et al., 2003b; Schaeffer et al., 2003; Cannon, Nedergaard, 2004; Augee et al., 2006; Saito et al., 2008; Schwartz et al., 2008; Polymeropoulos et al., 2012; Gaudry et al., 2018; Jastroch et al., 2018; Nedergaard, Cannon, 2018; Nowack et al., 2019; Fyda et al., 2020).

Таким образом, несмотря на наличие или отсутствие бурой жировой ткани, все плацентарные, сумчатые и однопроходные млекопитающие являются очевидными тахиметаболическими эндотермами (теплокровными).

#### Термогенез у птиц

Опубликованные данные свидетельствуют о том, что птицы, как и млекопитающие, используют SERCA и для мышечного сокращения, и для несократительного термогенеза при разобшении с транспортом Ca<sup>2+</sup>. На примере обыкновенной гаги *Somateria mollissima* (Dawson, Carey, 1976; Grav et al., 1988), королевских пингвинов *Aptenodytes patagonicus* (Duchamp et al., 1991) и мускусных уток *Cairina moschata* (Duchamp, Barré, 1993) показано, что основным источником теплоты у них являются скелетные мышцы и что нахождение на холоде увеличивает производство теплоты, усиливает активность двух изоформ SERCA (SERCA1a, SERCA2a) и рианодиновых рецепторов (Dumontel et al., 1995; Marmonier et al., 1997; Teulier et al., 2010). Тем не менее, роль сарколипина в несократительном термогенезе мышц птиц пока однозначно не доказана (Sahoo et al., 2015).

Несмотря на сходство структуры сарколипина птиц и млекопитающих (Bal et al., 2018), наблюдаются и некоторые различия (Montigny et al., 2014). Исследование на мускусных утках, подвергавшихся воздействию холода, показало, что несократительный термогенез их мышц связан с активацией птичьего разобщающего белка avUCP (avian uncoupling protein), который, в отличие от UCP1 млекопитающих, не связан с изменением протонной проводимости митохондриальной мембраны (Teulier et al., 2010). Кроме того, показано, что у мускусных утят есть способность к несократительному термогенезу с самого их вылупления (Teulier et al., 2014). Высказано также предположение, что транслокатор адениновых нуклеотидов в мышцах может быть еще одним потенциальным разобщающим белком в несократительном термогенезе птиц (Roussel et al., 2000; Talbot et al., 2004; Walter, Seebacher, 2009) и грызунов (Bal et al., 2016). Кроме того, транслокатор адениновых нуклеотидов способствует транспорту АТФ из митохондрий (Klin-

genberg, 2008; Kunji et al., 2016), и его количество увеличивается, когда потребность клетки в АТФ становится выше (Bal et al., 2016). Иными словами, транслокатор адениновых нуклеотидов и SERCA — не альтернативные (Ruuskanen et al., 2021), а взаимодополняющие функциональные единицы, транслокатор адениновых нуклеотидов действует как посредник несократительного термогенеза мышц на основе SERCA (Grigg et al., 2022).

Таким образом, у птиц, у которых нет бурой жировой ткани (Johnston, 1971; Saarela et al., 1991; Brigham, Trayhurn, 1994; Emre et al., 2007), несократительный термогенез происходит преимущественно в скелетных мышцах (Bicudo et al., 2001, 2002). Результаты исследований и то, насколько большую долю составляет масса скелетных мышц от массы тела, позволяют предположить (Grigg et al., 2004), что древний и контролируемый механизм постоянного несократительного термогенеза находится именно в скелетных мышцах, а один из его возможных источников — саркоплазматический ретикулум.

Исследование на юнко *Junco hyemalis* семейства воробьиных, подвергшихся воздействию холода, обнаружило у них невысокие значения активности сарколипина (Stager, Cheviron, 2020). Следовательно, не исключено, что в ряде случаев птицам может быть недостаточно тепла, выделяемого при несократительном термогенезе, и они дополнительно могут использовать для поддержания высокой температуры тела и сократительный (дрожательный) термогенез.

#### *Биохимические субстраты*

Несократительный термогенез мышц в первую очередь зависит от энергии АТФ, а производство АТФ митохондриями играет решающую роль, поэтому непрерывное производство тепла с помощью SERCA и у птиц, и у млекопитающих зависит от снабжения митохондрий субстратами, в основном жирными кислотами (Tucker, 1968, 1972; Torre-Bueno, Larochelle, 1978; Hudson, Bernstein, 1983; Jenni, Jenni-Eiermann, 1998; Ward et al., 2001; Toyomizu et al., 2002; Bundle et al., 2007; Guglielmo, 2010). Повышенное содержание митохондрий и белков, связанных с утилизацией жирных кислот в мышцах, показано у акклиматизированных к холоду мышей, крыс *Rattus rattus* и кроликов (Mollica et al., 2005; Bruton et al., 2010; Bal et al., 2016, 2017). Но млекопитающие и птицы различаются по источнику топлива для дрожательного термогенеза: у млекопитающих он зависит в основном от глюкозы (Haman, Blondin, 2017), а у птиц — от липидов (Swanson, 2010; Zhang et al., 2015) (рис. 3).

#### *Сходство биохимических механизмов термогенеза у млекопитающих и птиц и его эволюционное значение*

Биохимический механизм, управляющий несократительным термогенезом в мышцах у млекопитающих и птиц, основан на SERCA (Bicudo et al., 2001, 2002). В связи с этим высказана важная мысль: “если окажется, что у птиц и млекопитающих один и тот же механизм, это может означать, что эндотермия у этих двух групп имеет общее происхождение” (Grigg et al., 2004, p. 991). Учитывая, что со времени расхождения в эволюции синансид и зауропсид прошли сотни миллионов лет, можно с большой степенью уверенности говорить о гомологии между биохимическими процессами, лежащими в основе тахиметаболической эндотермии мышц у современных млекопитающих и птиц.

Есть множество научных публикаций с материалами сравнения различных молекулярных процессов, способствующих увеличению несократительного термогенеза в ответ на воздействие холода у современных плацентарных и неплацентарных млекопитающих и у птиц (Hashimoto et al., 1970; Chaffee, Roberts, 1971; Greenway, Himms-Hagen, 1978; Matoba, Murakami, 1981; Rudas, Pethes, 1984; Cheah et al., 1985; Barré, Nedergaard, 1987; Barré et al., 1989; Dumonteil et al., 1993, 1995; Block, 1994; Puigserver et al., 1998; Raimbault et al., 2001; Simonyan et al., 2001; Toyomizu et al., 2002; Schaeffer et al., 2003, 2005; Rose, Kuswanti, 2004; Talbot et al., 2004; Mollica et al., 2005; Hirabayashi et al., 2005; Ueda et al., 2005; Silva, 2006; Arruda et al., 2008; Ijiri et al., 2009; Jastroch et al., 2009; Rey et al., 2010; Shabalina et al., 2010; De Bruijn, Romero, 2011; Rowland et al., 2015a; Bal et al., 2016, 2017; Blix, 2016; Pant et al., 2016; Sirsat et al., 2016).

Все эти материалы демонстрируют серьезное сходство биохимических процессов при термогенезе у разных групп млекопитающих и птиц. Но несмотря на то, что гомологии в эволюции позвоночных распространены очень широко (Romer, Parsons, 1977; Smith, Morowitz, 2004), само по себе сходство в основных метаболических процессах мышечного несократительного термогенеза между птицами и млекопитающими вряд ли может быть убедительным доказательством этой гомологии. Однако, если бы эндотермия возникала у птиц и млекопитающих независимо, как принято считать в настоящее время, то между ними можно было бы ожидать гораздо больших различий (Grigg et al., 2004).

Приведенные в данной статье материалы говорят о том, что биохимические механизмы несократительного термогенеза, то есть тахиметаболической эндотермии, у млекопитающих (однопроходных, сумчатых и плацентарных) и у птиц гомологичны. Эти механизмы имеют общее происхождение, и они появились в эволюции очень давно, раньше, чем произошло разделение мле-

копитающих на однопроходных, сумчатых и плацентарных, и даже прежде, чем произошло разделение на синапсид и зауропсид, то есть задолго до появления птиц. Также современные данные говорят о том, что самый значимый орган, в котором происходят процессы несократительного термогенеза, у всех позвоночных — скелетные мышцы. Часть биохимического цикла расслабления—сокращения мышц служит, кроме прямого назначения, также и механизмом несократительного термогенеза, биохимической основой эндотермии.

Кроме того, разнообразные фактические материалы, которые могут быть использованы в качестве маркерных признаков уровня метаболизма и термобиологического статуса современных и вымерших позвоночных, а также непосредственные показатели уровня основного обмена, измеренные у современных животных и рассчитанные по определенным специально разработанным методикам для вымерших групп, позволили сделать важные выводы.

Даже ранние архозавроморфы возрастом около 250 млн лет уже имели достаточно высокие уровни основного обмена, сравнимые с таковыми у современных мелких млекопитающих (Grigg et al., 2022; обзоры: Черлин, 2021 а–г). Мало того, высокий уровень метаболизма был определен у раннепермских сеймуриаморфов *Semouria sanjuanensis* и *Discosauriscus austriacus* возрастом 290–270 млн лет (Estefa et al., 2020) и даже у стегоцефала ватчерии *Whatcheeria deltae* возрастом 331–326 млн лет (Whitney et al., 2022), то есть еще у амфибий, анамний, первых тетрапод, выползших на сушу.

Архозавры, многие птице- и ящеротазовые динозавры и др. имели средневысокий уровень метаболизма, и их термобиологический статус можно квалифицировать как мезометаболическую псилотермию, мезотермию. А некоторые двуногие ящеротазовые динозавры вообще достигли показателей обмена, сходных с показателями современных птиц — они были реально тахиметаболическими псилотермами, то есть эндотермными теплокровными животными. При этом современные крокодилы и родственные им группы уменьшили интенсивность основного обмена. Существуют данные, свидетельствующие о том, что и многие териодонты также, скорее всего, были уже почти или полностью эндотермными.

Другими словами, новые проведенные исследования показывают, что повышенный метаболизм и теплокровность не были характеристиками, развившимися у позвоночных в процессе длительной эволюции в комплексе с их общей морфофизиологической эволюцией. Похоже, что все эти характеристики появились у амниот изначально, после чего они перешли в формировавшиеся позже линии синапсид и зауропсид. А их раннее появление было важнейшей преадаптив-

ной (ароморфной) характеристикой — единым для всех позвоночных биохимическим механизмом эндогенного несократительного термогенеза. В этой связи вполне объяснимы и неувидительны современные данные о том, что первые наземные позвоночные, скорее всего, были животными с высокими уровнями метаболизма и температуры тела. Их мезометаболизм — естественное использование их преадаптивных биохимических свойств.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Основной биохимический термогенный орган у всех позвоночных — поперечнополосатые скелетные мышцы.

2. Основной биохимический механизм эндогенного термогенеза у позвоночных — часть цикла сокращения—расслабления мышц, связанная с транспортом  $Ca^{2+}$  через мембраны органелл клетки против градиента их концентрации.

3. Теплота выделяется в биохимических реакциях в акте сокращения мышц (сократительный термогенез), а также тогда, когда акт сокращения мышц по различным причинам не происходит, вместо чего энергия, которая должна была затрачиваться на сокращение мышц, выделяется в форме тепла (несократительный термогенез).

4. Причин, по которым не происходит акта сокращения мышц, в основном две: 1) блокировка акта сокращения с помощью сарколипина или норадреналина; 2) действие разобщающих белков внутренней мембраны митохондрий, которые пропускают через себя протоны без синтеза АТФ, чем способствуют преобразованию энергии, не израсходованной на создание протонного градиента, в тепло. Оба эти процесса происходят в организме животных параллельно.

5. Два типа термогенеза (сократительный и несократительный, термогенный) могут происходить в поперечнополосатой мускулатуре всех групп позвоночных от рыб до млекопитающих и птиц.

6. Теплота — неперенный побочный продукт акта сокращения мышц.

7. Несократительный термогенез — специфический термогенный акт, который у разных групп позвоночных используется при необходимости временно или постоянно поднимать и поддерживать температуру тела на высоком уровне. У холоднокровных животных он используется для локального нагрева определенных органов или частей тела, а также для временного нагрева всего тела в определенных необходимых ситуациях. Теплокровные животные отличаются от холоднокровных тем, что для них несократительный термогенез выступает основной биохимической базой для постоянного нагрева тела до температур выше 28–30°C и для поддержания в нем этой высокой температуры.

8. Биохимические механизмы сократительного и несократительного термогенезов во многом идентичны у всех групп позвоночных, что дает

возможность достаточно обоснованно предполагать, что в эволюции позвоночных эти механизмы появились в глубокой древности, во всяком случае, еще до разделения на зауропсид и синапсид.

9. Повышенный метаболизм и теплокровность не были характеристиками, развившимися у позвоночных в процессе длительной эволюции в комплексе с их общей морфофизиологической эволюцией. Они были первичным ароморфным событием, которое способствовало появлению и постепенному развитию у позвоночных комплекса морфофизиологических признаков разных групп теплокровных животных (архозавровых рептилий и птиц, продвинутых териодонтов и млекопитающих).

10. Биохимический механизм несократительного термогенеза как специфический биохимический термогенный акт является более или менее стандартным для всех позвоночных. Это может свидетельствовать о том, что именно этот механизм способен представлять собой важнейшее преадаптивное свойство, становящееся в дальнейшем базой (биохимическим ароморфозом) для морфофизиологической эволюции всевозможных групп позвоночных в направлении теплокровности.

11. Первые наземные позвоночные, скорее всего, были животными с высокими уровнями метаболизма и температуры тела. Их мезометаболизм — естественное использование их преадаптивных биохимических свойств.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Орлов Н.Л. Факультативная эндогенная терморегуляция питонов (Boidae, Pythoninae) и корреляция между эндотермными реакциями и поведенческой терморегуляцией // Зоол. журн. 1986. Т. 65. С. 551–559.
- Проссер Л. Сравнительная физиология животных. Т. 1. М.: Мир, 1977. 609 с.
- Трошин А.С., Трошина В.П. Физиология клетки. М.: Просвещение, 1978. 119 с.
- Черлин В.А. Гипотеза о механизмах эволюционного процесса и его канализации на примере позвоночных животных. 1. Эволюция, связанная с высокой температурой тела // Успехи соврем. биол. 2021а. Т. 141 (1). С. 78–104.
- Черлин В.А. Гипотеза о механизмах эволюционного процесса и его канализации на примере позвоночных животных. 2. Некоторые механизмы эволюционного процесса у позвоночных // Успехи соврем. биол. 2021б. Т. 141 (2). С. 189–208.
- Черлин В.А. Эволюция термобиологических статусов у позвоночных животных. 1. Температуры тела вымерших и современных рептилий // Журн. общ. биол. 2021в. Т. 82 (6). С. 445–458.
- Черлин В.А. Эволюция термобиологических статусов у позвоночных животных. 2. Развитие отношений с температурой у позвоночных животных // Журн. общ. биол. 2021г. Т. 82 (6). С. 459–477.
- Четанов Н.А., Лутвинов Н.А., Югов М.В. Влияние температуры на интенсивность метаболизма у двух видов круглголовок // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2014. Т. 16. № 5 (1). С. 445–447.
- Anderson K. Multi-omic analysis of hibernator skeletal muscle and calcium handling regulation. Th. ... M.S. Minnesota: Univ. of Minnesota, 2016. 67 p.
- Arruda A.P., Ketzler L.A., Nigro M. et al. Cold tolerance in hypothyroid rabbits: role of skeletal muscle mitochondria and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform 1 heat production // Endocrinology. 2008. V. 149. P. 6262–6271.
- Augee M.L. Monotremes and the evolution of homeothermy // Monotreme biology / Ed. M.L. Augee. Sydney: R. Zool. Soc. N.S.W., 1978. P. 111–120.
- Augee M.L., Gooden B., Musser A. Echidna: extraordinary egg-laying mammal. Clayton: CSIRO Publ., 2006. 136 p.
- Bal N.C., Maurya S.K., Sopariwala D.H. et al. Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals // Nat. Med. 2012. V. 18. P. 1575–1579.
- Bal N.C., Maurya S.K., Singh S. et al. Increased reliance on muscle-based thermogenesis upon acute minimization of brown adipose tissue function // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 17247–17257.
- Bal N.C., Maurya S.K., Pani S. et al. Mild cold induced thermogenesis: are BAT and skeletal muscle synergistic partners? // Biosci. Rep. 2017. V. 37. P. BSR20171087.
- Bal N.C., Sahoo S.K., Maurya S.K., Periasamy M. The role of sarcolipin in muscle nonshivering thermogenesis // Front. Physiol. 2018. V. 9. P. 1217. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01217>
- Bal N.C., Gupta S.C., Pan M. et al. Is upregulation of sarcolipin beneficial or detrimental to muscle function? // Front. Physiol. 2021. V. 12. P. 633058.
- Barré H., Nedergaard J. Cold-induced changes in Ca<sup>2+</sup> transport in duckling skeletal muscle mitochondria // Am. J. Physiol. 1987. V. 252. P. R1046–R1054.
- Barré H., Duchamp C., Rouanet J.-L. et al. Muscular nonshivering thermogenesis in cold-acclimated ducklings // Physiology of cold adaptation in birds / Eds C. Bech, R.E. Reinertsen. N.Y.: Plenum, 1989. P. 49–58.
- Bartholomew G.A. Physiological control of body temperature // Biology of the Reptilia. V. 12. Physiology C — Physiological Ecology / Eds C. Gans, F.H. Pough. N.Y.: Acad. Press, 1982. P. 167–211.
- Benedict F.G. The physiology of large reptiles with special reference to the heat production of snakes, tortoises, lizards and alligators. Washington: Carnegie Inst., 1932. 539 p.
- Bernal D., Donley J.M., Shadwick R.E., Syme D.A. Mammal-like muscles power swimming in a cold-water shark // Nature. 2005. V. 437. P. 1349–1352.
- Bicudo J.E., Vianna C.R., Chaui-Berlinck J.G. Thermogenesis in birds // Biosci. Rep. 2001. V. 21. P. 181–188.
- Bicudo J.E., Bianco A.C., Vianna C.R. Adaptive thermogenesis in hummingbirds // J. Exp. Biol. 2002. V. 205. P. 2267–2273.
- Blank J.M., Morrisette J.M., Farwell C.J. et al. Temperature effects on metabolic rate of juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* // J. Exp. Biol. 2007. V. 210. P. 4254–4261.

- Blix A.S.* Adaptations to polar life in mammals and birds // *J. Exp. Biol.* 2016. V. 219. P. 1093–1105.
- Block B.A.* Thermogenesis in muscle // *Ann. Rev. Physiol.* 1994. V. 56. P. 535–577.
- Bostrom B.L., Jones T.T., Hastings M., Jones D.R.* Behaviour and physiology: the thermal strategy of leatherback turtles // *PLoS One.* 2010. V. 5. Art. e13925.
- Brattstrom B.H., Collins R.* Thermoregulation // *Int. Turtle Tortoise Soc. J.* 1972. V. 16 (5). P. 15–19.
- Brigham R.M., Trayhurn P.* Brown fat in birds? A test for the mammalian BAT-specific mitochondrial uncoupling protein in common poorwills // *Condor.* 1994. V. 96. P. 208–211.
- Bruton J.D., Aydin J., Yamada T. et al.* Increased fatigue resistance linked to Ca<sup>2+</sup>-stimulated mitochondrial biogenesis in muscle fibres of cold-acclimated mice // *J. Physiol.* 2010. V. 588. P. 4275–4288.
- Bundle M.W., Hansen K.S., Dial K.P.* Does the metabolic rate-flight speed relationship vary among geometrically similar birds of different mass? // *J. Exp. Physiol.* 2007. V. 210. P. 1075–1083.
- Burness G., Diamond J., Flannery T.* Dinosaurs, dragons, and dwarfs: the evolution of maximal body size // *PNAS USA.* 2001. V. 98. P. 14518–14523.
- Cannon B., Nedergaard J.* Brown adipose tissue: function and physiological significance // *Physiol. Rev.* 2004. V. 84. P. 277–359.
- Cannon B., Golozubova V., Matthias A. et al.* Is there life in the cold without UCP1? Uncoupling proteins and thermoregulatory thermogenesis // *Life in the cold* / Eds G. Heldmaier, M. Klingenspor. 11th Int. Hibernat. Symp. (Jungholz, August 13–18, 2000). Berlin: Springer, 2000. P. 387–400.
- Carey F.G., Teal J.M.* Heat conservation in tuna fish muscle // *PNAS USA.* 1966. V. 56. P. 1464–1469.
- Carey F.G., Teal J.M.* Mako and porbeagle: warm-bodied sharks // *Com. Biochem. Physiol.* 1969. V. 28. P. 199–204.
- Chaffee R.R., Roberts J.C.* Temperature acclimation in birds and mammals // *Annu. Rev. Physiol.* 1971. V. 33. P. 155–202.
- Cheah K.S., Dauncey M.J., Cheah A.M., Ingram D.L.* Influence of environmental temperature and energy intake on porcine skeletal muscle mitochondria // *Comp. Biochem. Physiol.* 1985. V. 82. P. 287–292.
- Ciezarrek A.G., Osborne O.G., Shipley O.N. et al.* Phylotranscriptomic insights into the diversification of endothermic *Thunnus tunas* // *Mol. Biol. Evol.* 2019. V. 36. P. 84–96.
- Cloudsley-Thompson J.L.* Physiological thermoregulation in the spurred tortoise (*Testudo graeca*) // *J. Natur. Hist.* 1974. V. 8 (5). P. 577–587.
- Crawshaw L.I., Moffitt B.P., Lemons D.E., Downey J.A.* The evolutionary development of vertebrate thermoregulation // *Am. Sci.* 1981. V. 69 (5). P. 543–550.
- Da Costa D.C., Landeira-Fernandez A.M.* Thermogenic activity of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from blue marlin heater organ: regulation by KCl and temperature // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009. V. 297. R1460–R1468.
- Davenport J., Fraher J., Fitzgerald E. et al.* Fat head: an analysis of head and neck insulation in the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) // *J. Exp. Biol.* 2009. V. 212. P. 2753–2759.
- Davenport J., Jones T.T., Work T.M., Balazs G.H.* Topsy-turvy: turning the counter-current heat exchange of leatherback turtles upside down // *Biol. Lett.* 2015. V. 11. P. e20150592.
- Davesne D., Gueriau P., Dutheil D.B., Bertrand L.* Exceptional preservation of a Cretaceous intestine provides a glimpse of the early ecological diversity of spiny-rayed fishes (Acanthomorpha, Teleostei) // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 8509.
- Dawson W.R., Templeton J.R.* Physiological responses to temperature in the alligator lizard, *Gerrhonotus multicarinatus* // *Ecology.* 1966. V. 47. P. 759–765.
- Dawson T.J.* Responses to cold of monotremes and marsupials // *Animal adaptation to cold. Advances in comparative and environmental physiology.* V. 4 / Eds L.C.H. Wang, R.J. Brooks, J.A. Boulant. Berlin, Heidelberg: Springer, 1989. P. 255–288.
- Dawson W.R., Carey C.* Seasonal acclimatization to temperature in cardueline finches // *J. Comp. Physiol.* 1976. V. 112 (3). P. 317–333.
- De Andrade D.V.* Temperature effects on the metabolism of amphibians and reptiles: caveats and recommendations // *Amphibian and reptile adaptations to the environment: interplay between physiology and behavior* / Eds D.V. De Andrade, C.R. Bevier, J.E. De Carvalho. San Diego: CRC Press, 2016. P. 129–154.
- De Andrade D.V., Brito S.P., Toledo L.F., Abe A.S.* Seasonal changes in blood oxygen transport and acid-base status in the tegu lizard, *Tupinambis merianae* // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2004. V. 140. P. 197–208.
- De Bruijn R., Romero L.M.* Behavioral and physiological responses of wild-caught European starlings (*Sturnus vulgaris*) to a minor, rapid change in ambient temperature // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2011. V. 160. P. 260–266.
- Duchamp C., Barré H.* Skeletal muscle as the major site of nonshivering thermogenesis in cold-acclimated ducklings // *Am. J. Physiol.* 1993. V. 265. P. R1076–R1083.
- Duchamp C., Barré H., Rouanet J.L. et al.* Nonshivering thermogenesis in king penguin chicks. I. Role of skeletal muscle // *Am. J. Physiol.* 1991. V. 261. P. R1438–R1445.
- Dumonteil E., Barré H., Meissner G.* Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and ryanodine receptor in cold-acclimated ducklings and thermogenesis // *Am. J. Physiol.* 1993. V. 265. P. C507–C513.
- Dumonteil E., Barré H., Meissner G.* Expression of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport proteins in cold-acclimating ducklings // *Am. J. Physiol.* 1995. V. 269. P. C955–C960.
- Dunlap D.G.* Influence of temperature and duration of acclimation, time of day, sex and body weight on metabolic rates in the hylid frog, *Acris crepitans* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1969. V. 31. P. 555–570.
- Dutton R.H., Fitzpatrick L.C.* Metabolic compensation to seasonal temperatures in the rusty lizard, *Sceloporus olivaceus* // *Comp. Biochem. Physiol. A.* 1975. V. 51. P. 309–318.
- Eldershaw T.P.D., Ye J., Clarke M.J., Colquhoun E.Q.* Vasoconstrictor-induced thermogenic switching in ectotherm and endotherm muscle // *Adaptations to the cold* / Eds F. Geiser, A.J. Hulbert, S.C. Nicol. 10th Int. Hibernat. Symp. (Tasmania, 30 June–6 July, 1996) Armidale: Univ. N. Eng. Press, 1996. P. 311–317.
- Emre Y., Hurtaud C., Ricquier D. et al.* Avian UCP: the killjoy in the evolution of the mitochondrial uncoupling proteins // *J. Mol. Evol.* 2007. V. 65. P. 392–402.
- Engbretson G.A., Livezey R.L.* The effects of aggressive display on body temperature in the fence lizard *Sceloporus occidentalis occidentalis* Baird and Girard // *Physiol. Biochem. Zool.* 1972. V. 45. P. 247–254.
- Estéfa J., Klembara J., Tafforeau P., Sanchez S.* Limb-bone development of seymouriamorphs: implications for the

- evolution of growth strategy in stem amniotes // *Front. Earth Sci.* 2020. V. 8. Art. 97. P. 1–21.
- Fair W., Ackman R.G., Mrosovsky N. Body temperature of *Dermochelys coriacea*: warm turtle from cold water // *Science*. 1972. V. 177. P. 791–793.
- Filali-Zegzouti Y., Abdelmelek H., Rouanet J.L. et al. Role of catecholamines in glucagon-induced thermogenesis // *J. Neural. Transm.* 2005. V. 112. P. 481–489.
- Franck J.P.C., Slight-Simcoe E., Wegner N.C. Endothermy in the smalleye opah (*Lampris incognitus*): a potential role for the uncoupling protein sarcolipin // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2019. V. 233. P. 48–52.
- Fyda T.J., Spencer C., Jastroch M., Gaudry M. Disruption of thermogenic UCP1 predated the divergence of pigs and peccaries // *J. Exp. Biol.* 2020. V. 223. P. jeb223974. <https://doi.org/10.1242/jeb.223974>
- Galvao P.E., Tarasantchi J., Guertzenstein P. Heat production of tropical snakes // *Am. J. Physiol.* 1965. V. 209. P. 501–506.
- Gaudry M.J., Jastroch M., Treberg J.R. et al. Inactivation of thermogenic UCP1 as a historical contingency in multiple placental mammal clades // *Sci. Adv.* 2017. V. 3. P. e1602878.
- Gaudry M.J., Campbell K.L., Jastroch M. Evolution of UCP1 // *Brown adipose tissue* / Eds A. Pfeifer, M. Kingenspor, S. Herzig. Cham: Springer, 2018. P. 127–141.
- Geiser F. Daily torpor and thermoregulation in *Antechinus* (Marsupialia): influence of body mass, season, development, reproduction, and sex // *Oecologia*. 1988. V. 77. P. 395–399.
- Geiser F., Körtner G. Hibernation and daily torpor in Australian mammals // *Austr. Zool.* 2010. V. 35. P. 204–215.
- Grav H.J., Borch-Iohnsen B., Dahl H.A. et al. Oxidative capacity of tissues contributing to thermogenesis in eider (*Somateria mollissima*) ducklings: changes associated with hatching // *J. Comp. Physiol. B.* 1988. V. 158. P. 513–518.
- Greenway D.C., Himms-Hagen J. Increased calcium uptake by muscle mitochondria of cold-acclimated rats // *Am. J. Physiol.* 1978. V. 234. P. C7–C13.
- Greer A.E., Lazell J.D., Wright R.M. Anatomical evidence for a counter-current heat exchanger in the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) // *Nature*. 1973. V. 244. P. 181.
- Grigg G.C. An evolutionary framework for studies of hibernation and shortterm torpor // *Life in the cold* / Eds B.M. Barnes, H.V. Carey. 12th Int. Hibernat. Symp. (Vancouver, 25 July–1 August, 2004). Fairbanks: Institute of Arctic Biology, University of Alaska, 2004. P. 131–141.
- Grigg G.C., Beard L. Hibernation by echidnas in mild climates: hints about the evolution of endothermy? // *Life in the cold* / Eds G. Heldmaier, M. Klingenspor. 11th Int. Hibernat. Symp. (Jungholz, August 13–18, 2000). Berlin: Springer, 2000. P. 5–20.
- Grigg G.C., Beard L.A., Augee M.L. Hibernation in a monotreme, the echidna (*Tachyglossus aculeatus*) // *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 1989. V. 92. P. 609–612.
- Grigg G.C., Augee M., Beard L. Thermal relations of free-living echidnas during activity and in hibernation in a cold climate // *Platypus and echidnas* / Ed. M.L. Augee. Mosman: R. Zool. Soc. N.S.W., 1992. P. 160–173.
- Grigg G.C., Beard L.A., Augee M.L. The evolution of endothermy and its diversity in mammals and birds // *Physiol. Biochem. Zool.* 2004. V. 77. P. 982–997.
- Grigg G., Nowack J., Bicudo J.E.P.W. et al. Whole-body endothermy: ancient, homologous and widespread among the ancestors of mammals, birds and crocodylians // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2022. V. 97. P. 766–801.
- Guglielmo C.G. Move that fatty acid: fuel selection and transport in migratory birds and bats // *Integr. Comp. Biol.* 2010. V. 50. P. 336–345.
- Haman F., Blondin D.P. Shivering thermogenesis in humans: origin, contribution and metabolic requirement // *Temperature*. 2017. V. 4. P. 217–226.
- Harlow P., Grigg G. Shivering thermogenesis the production of heat, especially within the animal body thermogenesis in brooding diamond python, *Python spilotes spilotes* // *Copeia*. 1984. V. 4. P. 959–965.
- Hashimoto Y., Nishimura T., Kurobe Y. et al. Effect of 3',5'-dimethylpyrazole on colonic temperature, plasma glucose, NEFA and corticosterone in the non-acclimated rats subjected to cold // *Jpn. J. Pharm.* 1970. V. 20. P. 441–442.
- Hayward J.S., Lisson P.A. Evolution of brown fat: its absence in marsupials and monotremes // *Can. J. Zool.* 1992. V. 70. P. 171–179.
- Hirabayashi M., Ijiri D., Kamei Y. et al. Transformation of skeletal muscle from fast- to slow-twitch during acquisition of cold tolerance in the chick // *Endocrinology*. 2005. V. 146. P. 399–405.
- Holloway J.C., Geiser F. Seasonal changes in the thermoenergetics of the marsupial sugar glider, *Petaurus breviceps* // *J. Com. Physiol.* 2001. V. 171. P. 643–650.
- Hudson J.W., Bertram F.W. Physiological responses to temperature in the ground skink, *Lygosoma laterale* // *Physiol. Zool.* 1966. V. 39. P. 21–29.
- Hudson D.M., Bernstein M.H. Gas exchange and energy cost of flight in the white-necked raven, *Corvus cryptoleucus* // *J. Experim. Biol.* 1983. V. 103. P. 121–130.
- Huey R.B. Temperature, physiology and the ecology of reptiles // *Biology of the reptilia*. V. 12 / Ed. C. Gans. L.: Acad. Press, 1982. P. 25–92.
- Huey R.B., Slatkin M. Cost and benefits of lizard thermoregulation // *Q. Rev. Biol.* 1976. V. 51. P. 363–384.
- Hutchison V.H., Dowling H.D., Vinegar A. Thermoregulation in a brooding female Indian python, *Python molurus bivittatus* // *Science*. 1966. V. 151. P. 694–696.
- Ijiri D., Miura M., Kanai Y., Hirabayashi M. Increased mass of slow-type skeletal muscles and depressed myostatin gene expression in cold-tolerant chicks // *Zool. Sci.* 2009. V. 26. P. 277–283.
- Jastroch M., Withers K.W., Stoehr S., Klingenspor M. Mitochondrial proton conductance in skeletal muscle of a cold-exposed marsupial, *Antechinus flavipes*, is unlikely to be involved in adaptive nonshivering thermogenesis but displays increased sensitivity toward carbon-centered radicals // *Physiol. Biochem. Zool.* 2009. V. 82. P. 447–454.
- Jastroch M., Oelkrug R., Keipert S. Insights into brown adipose tissue evolution and function from non-model organisms // *J. Exp. Biol.* 2018. V. 221. P. jeb169425.
- Jenni L., Jenni-Eiermann S. Fuel supply and metabolic constraints in migrating birds // *J. Avian Biol.* 1998. V. 29. P. 521–528.
- Johnson C.R. Thermoregulation in crocodylians. I. Head-body temperature control in the papuan-New Guinean crocodiles, *Crocodylus novoaguineae* and *Crocodylus porosus* // *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 1974. V. 49 (1). P. 3–28.
- Johnston D.W. The absence of brown adipose tissue in birds // *Comp. Biochem. Physiol. A Com. Physiol.* 1971. V. 40. P. 1107–1108.
- Kabat A.P., Rose R.W., Harris J., West A.K. Molecular identification of uncoupling proteins (UCP2 and UCP3) and absence of UCP1 in the marsupial Tasmanian bet-tong, *Betongia gaimardi* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2003a. V. 134. P. 71–77.

- Kabat A.P., Rose R.W., West A.K. Nonshivering thermogenesis in a carnivorous marsupial, *Sarcophilus harrisi*, in the absence of UCP1 // *J. Therm. Biol.* 2003b. V. 28. P. 413–420.
- Kaspari R.R., Reyna-Neyra A., Jung L. et al. The paradoxical lean phenotype of hypothyroid mice is marked by increased adaptive thermogenesis in the skeletal muscle // *PNAS USA*. 2020. V. 117. P. 22545–22551.
- Klingenberg M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1778. P. 1978–2021.
- Kohler M., Marin-Moratalla N., Jordana X., Aanes R. Seasonal bone growth and physiology in endotherms shed light on dinosaur physiology // *Nature*. 2012. V. 487. P. 358–361.
- Kunji E.R., Aleksandrova A., King M.S. et al. The transport mechanism of the mitochondrial ADP/ATP carrier // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. V. 1863. P. 2379–2393.
- Lamarre-Picquot P. Troisieme memoires sur l'incubation et quatre phenomenes observes chez les ophidiens. Paris: Comp. Rend., Acad. Sci., 1842. V. 14. P. 164.
- Legendre L.J., Davesne D. The evolution of mechanisms involved in vertebrate endothermy // *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2020. V. 375 (1793). P. e20190136.
- Marmonier F., Duchamp C., Cohen-Adad F. et al. Hormonal control of thermogenesis in perfused muscle of muscovy ducklings // *Am. J. Physiol.* 1997. V. 273. P. R1638–R1648.
- Matoba H., Murakami N. Histochemical changes of rat skeletal muscles induced by cold acclimation // *Jpn. J. Physiol.* 1981. V. 31. P. 273–278.
- Maurya S.K., Herrera J.L., Sahoo S.K. et al. Sarcolipin signaling promotes mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in skeletal muscle // *Cell Rep.* 2018. V. 24. P. 2919–2931.
- Mollica M.P., Lionetti L., Crescenzo R. et al. Cold exposure differently influences mitochondrial energy efficiency in rat liver and skeletal muscle // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. P. 1978–1982.
- Montigny C., Decottignies P., Le Marechal P. et al. S-palmitoylation and s-oleoylation of rabbit and pig sarcolipin // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 33850–33861.
- Morrisette J.M., Franck J.P., Block B.A. Characterization of ryanodine receptor and Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoforms in the thermogenic heater organ of blue marlin (*Makaira nigricans*) // *J. Exp. Biol.* 2003. V. 206. P. 805–812.
- Nedergaard J., Cannon B. Brown adipose tissue as a heat-producing thermoeffector // *Handb. Clin. Neurol.* 2018. V. 156. P. 137–152.
- Nicol S.C. Energy homeostasis in monotremes // *Front. Neurosci.* 2017. V. 11. P. 195.
- Nicol S.C., Andersen N.A. Rewarming rates and thermogenesis in hibernating echidnas // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2008. V. 150. P. 189–195.
- Nicolaisen T.S., Klein A.B., Dmytriyeva O. et al. Thyroid hormone receptor  $\alpha$  in skeletal muscle is essential for T3-mediated increase in energy expenditure // *FASEB J.* 2020. V. 34. P. 15480–15491.
- Nowack J., Giroud S., Arnold W., Ruf T. Muscle nonshivering thermogenesis and its role in the evolution of endothermy // *Front. Physiol.* 2017. V. 8. P. 889.
- Nowack J., Vetter S.G., Stalder G. et al. Muscle nonshivering thermogenesis in a feral mammal // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 6378.
- Oliver S.R., Anderson K.J., Hunstiger M.M., Andrews M.T. Turning down the heat: down-regulation of sarcolipin in a hibernating mammal // *Neurosci. Lett.* 2019. V. 696. P. 13–19.
- Pant M., Bal N.C., Periasamy M. Sarcolipin: a key thermogenic and metabolic regulator in skeletal muscle // *Tr. Endocrinol. Metab.* 2016. V. 27. P. 881–892.
- Paladino F.V., O'Connor M.P., Spotila J.R. Metabolism of leatherback turtles, gigantothermy and thermoregulation of dinosaurs // *Nature*. 1990. V. 344. P. 858–860.
- Pearson O.P., Bradford D.F. Thermoregulation of lizards and toad at high altitudes in Peru // *Copeia*. 1976. № 1. P. 155–170.
- Polymeropoulos E.T., Jastroch M., Frappell P.B. Absence of adaptive nonshivering thermogenesis in a marsupial, the fat-tailed dunnart (*Sminthopsis crassicaudata*) // *J. Comp. Physiol.* 2012. V. 182. P. 393–401.
- Puigserver P., Wu Z., Park C.W. et al. A cold-inducible co-activator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis // *Cell*. 1998. V. 92. P. 829–839.
- Raimbault S., Dridi S., Denjean F. et al. An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds // *Biochem. J.* 2001. V. 353. P. 441–444.
- Rey B., Roussel D., Romestaing C. et al. Upregulation of avian uncoupling protein in cold-acclimated and hyperthyroid ducklings prevents reactive oxygen species production by skeletal muscle mitochondria // *BMC Physiol.* 2010. V. 10. P. 5.
- Romer A.S., Parsons T.S. The vertebrate body. Philadelphia: Saunders Co., 1977. 624 p.
- Rose R.W., Kuswanti N. Thyroid function and the development of endothermy in a marsupial, the Tasmanian bettong, *Bettongia gaimardi* (Demarest 1822) // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2004. V. 136. P. 17–22.
- Rose R.W., West A.K., Ye J.M. et al. Nonshivering thermogenesis in a marsupial (the Tasmanian bettong, *Bettongia gaimardi*) is not attributable to brown adipose tissue // *Physiol. Biochem. Zool.* 1999. V. 72. P. 699–704.
- Rothwell N.J., Stock M.J. Biological distribution and significance of brown adipose tissue // *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 1985. V. 82. P. 745–751.
- Rotter D., Peiris H., Grinsfelder D.B. et al. Regulator of calcineurin 1 helps coordinate whole-body metabolism and thermogenesis // *EMBO Rep.* 2018. V. 19. P. e44706.
- Roussel D., Chainer F., Rouanet J.L., Barré H. Increase in the adenine nucleotide translocase content of duckling subsarcolemmal mitochondria during cold acclimation // *FEBS Lett.* 2000. V. 477. P. 141–144.
- Rowland L.A., Bal N.C., Kozak L.P., Periasamy M. Uncoupling protein 1 and sarcolipin are required to maintain optimal thermogenesis, and loss of both systems compromises survival of mice under cold stress // *J. Biol. Chem.* 2015a. V. 290. P. 12282–12289.
- Rowland L.A., Bal N.C., Periasamy M. The role of skeletal-muscle-based thermogenic mechanisms in vertebrate endothermy // *Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.* 2015b. V. 90. P. 1279–1297.
- Rowlatt U., Mrosovsky N., English A. A comparative survey of brown fat in the neck and axilla of mammals at birth // *Biol. Neonate*. 1971. V. 17. P. 53–83.
- Rudas P., Pethes G. Studies on the conversion of thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine in normal and thyroidectomized chickens // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1984. V. 54. P. 154–161.
- Runcie R.M., Dewar H., Hawn D.R. et al. Evidence for cranial endothermy in the opah (*Lampris guttatus*) // *J. Exp. Biol.* 2009. V. 212. P. 461–470.
- Ruuskanen S., Hsu B.-Y., Nord A. Endocrinology of thermoregulation in birds in a changing climate // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2021. V. 519. P. 111088.

- Saarela S., Keith J.S., Hohtola E., Trayhurn P. Is the "mammalian" brown fat-specific mitochondrial uncoupling protein present in adipose tissues of birds? // *Comp. Biochem. Physiol.* 1991. V. 100. P. 45–49.
- Saito S., Saito C.T., Shingai R. Adaptive evolution of the uncoupling protein 1 gene contributed to the acquisition of novel nonshivering thermogenesis in ancestral eutherian mammals // *Gene*. 2008. V. 408. P. 37–44.
- Sahoo S.K., Shaikh S.A., Sopariwala D.H. et al. The N terminus of sarcolipin plays an important role in uncoupling sarco-endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA) ATP hydrolysis from  $Ca^{2+}$  transport // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 14057–14067.
- Sanders C.J., Santos I.R., Maher D.T. et al. Dissolved iron exports from an estuary surrounded by coastal wetlands: can small estuaries be a significant source of Fe to the ocean? // *Marine Chem.* 2015. V. 176. P. 75–82.
- Sapsford C.W., Hughes G.R. Body temperature of the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* and the leatherback sea turtle *Dermochelys coriacea* during nesting // *Zool. Afr.* 1978. V. 18 (1). P. 63–69.
- Schaeffer P.J., Villarín J.J., Lindstedt S.L. Chronic cold exposure increases skeletal muscle oxidative structure and function in *Monodelphis domestica*, a marsupial lacking brown adipose tissue // *Physiol. Biochem. Zool.* 2003. V. 76. P. 877–887.
- Schaeffer P.J., Villarín J.J., Pierotti D.J. et al. Cost of transport is increased after cold exposure in *Monodelphis domestica*: training for inefficiency // *J. Exp. Biol.* 2005. V. 208. P. 3159–3167.
- Schwartz T.S., Murray S., Seebacher F. Novel reptilian uncoupling proteins: molecular evolution and gene expression during cold acclimation // *Proc. Biol. Sci.* 2008. V. 275. P. 979–985.
- Seebacher F., Grigg G.C., Beard L.A. Crocodiles as dinosaurs: behavioural thermoregulation in very large ectotherms leads to high and stable body temperatures // *J. Exp. Biol.* 1999. V. 202. P. 77–86.
- Sepulveda C., Dickson K., Frank L., Graham J. Cranial endothermy and a putative brain heater in the most basal tuna species, *Allothunnus fallai* // *J. Fish Biol.* 2007. V. 70. P. 1720–1733.
- Sepulveda C., Dickson K., Bernalk D. et al. Elevated red myotomal muscle temperatures in the most basal tuna species, *Allothunnus fallai* // *J. Fish Biol.* 2008. V. 73. P. 241–249.
- Shabalina I.G., Hoeks J., Kramarova T.V. et al. Cold tolerance of UCP1-ablated mice: a skeletal muscle mitochondria switch toward lipid oxidation with marked UCP3 up-regulation not associated with increased basal, fatty acid- or ROS-induced uncoupling or enhanced GDP effects // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1797. P. 968–980.
- Silva J.E. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation // *Physiol. Rev.* 2006. V. 86. P. 435–464.
- Simonyan R.A., Jimenez M., Ceddia R.B. et al. Cold-induced changes in the energy coupling and the UCP3 level in rodent skeletal muscles // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. V. 1505. P. 271–279.
- Sirsat S.K., Sirsat T.S., Crossley J.L. et al. The 12-day thermoregulatory metamorphosis of red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) // *J. Comp. Physiol.* 2016. V. 186. P. 651–663.
- Slip D.J., Shine R. Reptilian endothermy: a field study of thermoregulation by brooding diamond pythons // *J. Zool.* 1988. V. 216 (2). P. 367–378.
- Smith E.N. Thermoregulation of the American alligator, *Alligator mississippiensis* // *Physiol. Zool.* 1975. V. 48 (2). P. 177–194.
- Smith E., Morowitz H.J. Universality in intermediary metabolism // *PNAS USA.* 2004. V. 101. P. 13168–13173.
- Smith W.S., Broadbridge R., East J.M., Lee A.G. Sarcolipin uncouples hydrolysis of ATP from accumulation of  $Ca^{2+}$  by the  $Ca^{2+}$ -ATPase of skeletal-muscle sarcoplasmic reticulum // *Biochem. J.* 2002. V. 361. P. 277–286.
- Snow R.W., Wolf A.J., Greeves B.W. et al. Thermoregulation by a brooding Burmese python (*Python molurus bivittatus*) in Florida // *Southeast. Nat.* 2010. V. 9. P. 403–405.
- Stager M., Cheviron Z.A. Is there a role for sarcolipin in avian facultative thermogenesis in extreme cold? // *Biol. Lett.* 2020. V. 16. P. 20200078.
- Stahlschmidt Z.R., Denardo D.F. Effect of nest temperature on egg-brooding dynamics in Children's pythons // *Physiol. Behav.* 2009. V. 98. P. 302–306.
- Standora E.A., Spotila J.R., Foley R.E. Regional endothermy in the sea turtle, *Chelonia mydas* // *J. Therm. Biol.* 1982. V. 7. P. 159–165.
- Stevens E.D. The retia // *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment* / Ed. A.P. Farrell. San Diego: Acad. Press, 2011. P. 1119–1131.
- Swanson D. Seasonal metabolic variation in birds: functional and mechanistic correlates // *Current ornithology.* V. 17 / Ed. C.F. Thompson. N.Y.: Springer, 2010. P. 75–129.
- Talbot D.A., Duchamp C., Rey B. et al. Uncoupling protein and ATP/ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins // *J. Physiol.* 2004. V. 558. P. 123–135.
- Tattersall G.J. Reptile thermogenesis and the origins of endothermy // *Zoology.* 2016. V. 119. P. 403–405.
- Tattersall G.J., Milsom W.K., Abe A.S. et al. The thermogenesis of digestion in rattlesnakes // *J. Exp. Biol.* 2004. V. 207. P. 579–585.
- Tattersall G.J., Leite C.A., Sanders C.E. et al. Seasonal reproductive endothermy in tegu lizards // *Adv.* 2016. V. 2. P. e1500951
- Teulier L., Rouanet J.L., Letexier D. et al. Cold-acclimation-induced nonshivering thermogenesis in birds is associated with upregulation of avian UCP but not with innate uncoupling or altered ATP efficiency // *J. Exp. Biol.* 2010. V. 213. P. 2476–2482.
- Teulier L., Rouanet J.L., Rey B., Roussel D. Ontogeny of nonshivering thermogenesis in muscovy ducklings (*Cairina moschata*) // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2014. V. 175. P. 82–89.
- Tigerstedt R. Die Produktion von Wärme und der Wärmehaushalt. Handbuch der vergleichenden Physiologie / Herausg. von H. Winterstein. Jéna: Springer, 1910. 1060 S.
- Torre-Bueno J.R., Larochelle J. The metabolic cost of flight in unrestrained birds // *J. Exp. Biol.* 1978. V. 75. P. 223–229.
- Toyomizu M., Ueda M., Sato S. et al. Cold-induced mitochondrial uncoupling and expression of chicken UCP and ANT mRNA in chicken skeletal muscle // *FEBS Lett.* 2002. V. 529. P. 313–318.
- Tucker V.A. Respiratory exchange and evaporative water loss in the flying budgerigar // *J. Exp. Biol.* 1968. V. 48. P. 67–87.
- Tucker V.A. Metabolism during flight in the laughing gull, *Larus atricilla* // *Am. J. Physiol.* 1972. V. 222. P. 237–245.
- Ueda M., Watanabe K., Sato K. et al. Possible role for avPGC-1 $\alpha$  in the control of expression of fiber type, along with avUCP and avANT mRNAs in the skeletal muscles of cold-exposed chickens // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. P. 11–17.

- Valensiennes A.* Observations faites pendant l'incubation d'une femelle du python a deux raies (*Python bivittatus*, Kuhl.) pendant les mois de mai et de juin 1841. Paris: Comp. Rend. Acad. Sci., 1841. V. 13. P. 126–133.
- van Mierop L.H.S., Barnard S.M.* Observations on the reproduction of *Python molurus bivittatus* (Reptilia, Serpentes, Boidae) // *J. Herpetol.* 1976a. V. 10 (4). P. 333–340.
- van Mierop L.H.S., Barnard S.M.* Thermoregulation in a brooding female *Python molurus bivittatus* (Serpentes: Boidae) // *Copeia.* 1976b. № 2. P. 398–401.
- Vernon H.M.* The relation of the respiratory exchange of cold-blooded animals to temperature // *J. Physiol.* 1897. V. 21. P. 443–496.
- Walter I., Seebacher F.* Endothermy in birds: underlying molecular mechanisms // *J. Exp. Biol.* 2009. V. 212. P. 2328–2336.
- Wang W.P., Wang J.Y., Lin W.H. et al.* Progerin in muscle leads to thermogenic and metabolic defects via impaired calcium homeostasis // *Aging Cell.* 2020. V. 19. P. e13090.
- Ward S., Moller U., Rayner J.M. et al.* Metabolic power, mechanical power and efficiency during wind tunnel flight by the European starling *Sturnus vulgaris* // *J. Exp. Biol.* 2001. V. 204. P. 3311–3322.
- Watanabe Y., Goldman K., Caselle J. et al.* Comparative analyses of animal-tracking data reveal ecological significance of endothermy in fishes // *PNAS USA.* 2015. V. 112. P. 6104–6109.
- Wegner N.C., Snodgrass O.E., Dewar H., Hyde J.R.* Animal physiology. Whole-body endothermy in a mesopelagic fish, the opah, *Lampris guttatus* // *Science.* 2015. V. 348. P. 786–789.
- Whitney M.R., Otoo B.K.A., Angielczyk K.D., Pierce S.E.* Fossil bone histology reveals ancient origins for rapid juvenile growth in tetrapods // *Commun. Biol.* 2022. V. 5. P. 1280.
- Ye J.M., Edwards S.J., Rose R.W. et al.* Vasoconstrictors alter oxygen, lactate, and glycerol metabolism in the perfused hindlimb of a rat kangaroo // *Am. J. Physiol.* 1995. V. 268. P. R1217–R1223.
- Ye J.M., Edwards S.J., Rose R.W. et al.* Alpha-adrenergic stimulation of thermogenesis in a rat kangaroo (*Marsupialia, Bettongia gaimardi*) // *Am. J. Physiol.* 1996. V. 271. P. R586–R582.
- Zhang Y., Carter T., Eyster K., Swanson D.L.* Acute cold and exercise training up-regulate similar aspects of fatty acid transport and catabolism in house sparrows (*Passer domesticus*) // *J. Exp. Biol.* 2015. V. 218. P. 3885–3893.

## Preadaptivity of Non-Contractive Thermogenesis in the Evolution of Warm-Bloodedness in Vertebrates

V. A. Cherlin\*

*Dagestan State University, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russia*

\*e-mail: cherlin51@mail.ru

Most of the heat that is released in the vertebrate body is produced in the muscles during contractive (during movement or trembling) and non-contractive (without muscle activity) thermogenesis. Contractive thermogenesis is characteristic for all vertebrates, but it is not able to constantly maintain a high body temperature in animals. The main idea discussed in this article, and based on a large number of publications in recent years: the main biochemical base of warm-bloodedness in vertebrates is part of the cycle of contraction–relaxation of striated skeletal muscles, in which the act of muscle contraction somehow falls out, and the energy that should have been used for it is dissipated in the form of heat. This non-contractive thermogenesis, which is able to support the regional and general endothermy in vertebrates, can be considered the real biochemical basis of warm-bloodedness. Thus, the presence of skeletal muscles in all vertebrates and the common biochemical foundations of the contraction–relaxation cycle represent a single preadaptive property of the manifestation of non-contractive thermogenesis in all vertebrates, starting with fish, which is the basis for the evolution of warm-bloodedness. Therefore, it is understandable and unsurprising modern data that the first terrestrial vertebrates were most likely animals with high levels of both metabolism and body temperature.

*Keywords:* biochemistry of non-contractive thermogenesis, warm-bloodedness, evolution of warm-bloodedness

УДК 581.527.7(470+571)

## ИНВАЗИОННЫЕ РАСТЕНИЯ РОССИИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ИНВЕНТАРИЗАЦИИ, ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ И ВОПРОСЫ УПРАВЛЕНИЯ

© 2023 г. С. А. Сенатор<sup>1</sup>, \*, Ю. К. Виноградова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва, Россия

\*e-mail: stsenator@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.03.2023 г.

После доработки 07.04.2023 г.

Принята к публикации 07.04.2023 г.

Глобализация, расширение торговых связей, меж- и внутриконтинентальных перемещений населения, развитие транспортных сетей между странами привели к активному расселению многих видов растений за пределы их естественных ареалов. Среди таких растений выделяется группа инвазионных видов — тех, чье распространение имеет серьезные экологические, экономические и социальные последствия. Статья содержит сведения о результатах инвентаризации инвазионных видов сосудистых растений, произрастающих в РФ, а также обзор действий, предпринимаемых в стране с целью управления инвазионными видами растений. В настоящее время в России насчитывается 584 инвазионных вида сосудистых растений, из которых самыми распространенными являются *Acer negundo*, *Echinocystis lobata* и *Erigeron canadensis*. Приходится констатировать, что до настоящего времени и законодательные акты, регулирующие политику в области инвазионных видов (исключение составляет правовое регулирование фитокарантина), и национальная стратегия по чужеродным видам в России отсутствуют. Эффективное управление биологическими инвазиями может работать в том случае, если широкая общественность осведомлена о неблагоприятных последствиях вторжения инвазионных видов.

**Ключевые слова:** чужеродные виды, биологические инвазии, глобальные изменения, Российская Федерация

**DOI:** 10.31857/S0042132423040099, **EDN:** RRCHXT

### ВВЕДЕНИЕ

Глобализация в сочетании с расширением торговых связей, меж- и внутриконтинентальных перемещений населения, развитием транспортных сетей между странами привела к активному расселению многих видов растений вне пределов их естественных ареалов (Lambdon et al., 2008; Dawson et al., 2017; Rušek et al., 2017; van Kleunen et al., 2019). Такие виды принято называть чужеродными, реже используются термины: адвентивные, чужеземные, alien, non-indigenous, non-native, exotic, adventive plants (Баранова и др., 2018; Rušek, 1995; Richardson et al., 2011). В то же время лишь небольшая часть чужеродных видов представлена самоподдерживающимися популяциями — это так называемые натурализовавшиеся виды, среди которых выделяется группа инвазионных видов — тех, чье распространение имеет серьезные экологические, экономические и социальные последствия (Richardson et al., 2011; Blackburn et al., 2019; Rušek et al., 2020).

Предполагается, что в среднем 10% видов растений из любого региона являются потенциально

инвазионными (Dogra et al., 2010). Таким образом, из 39 100 видов сосудистых растений, известных в настоящее время (The state..., 2016), 39100 являются потенциальными захватчиками. Установлено, что очаги видового богатства натурализовавшихся растений располагаются на западном и восточном побережьях Северной Америки, в Северо-Западной Европе, Южной Африке, Юго-Восточной Австралии, Новой Зеландии и Индии (Rušek et al., 2017). Считается, что на континентах более 20% видов растений чужеродны, тогда как на островах — 50% или более (Rejmanek, Randall, 1994; Dogra et al., 2010). При этом численность натурализовавшихся видов тесно коррелирует с численностью аборигенных видов (Rušek et al., 2017).

В настоящее время имеются сведения о видовом богатстве чужеродных растений в крупных регионах Земли. Так, в Новом Свете известно 9905 видов чужеродных растений, в Старом Свете — 7923 видов. При этом для умеренного зонобиома (в обоих полушариях) отмечено 9036 видов, тогда как для арктического — 321 (Rušek et al., 2017). В то же время данные о разнообразии чужеродных ви-

дов на национальном или региональном уровнях, необходимые для понимания причин и механизмов расселения инвазионных видов и разработки методов контроля их численности, фрагментарны. В связи с этим большое значение приобретает инвентаризация инвазионных видов, которая является основой для разработки стратегического долгосрочного плана сохранения естественного биоразнообразия и предотвращения их вторжения. В Глобальной рамочной программе в области биоразнообразия на период после 2020 г. (Предлагаемые основные индикаторы..., 2021, с. 11–12) сформулированы задачи “регулирования путей интродукции инвазионных чужеродных видов наряду с предупреждением или сокращением темпов их интродукции и распространения как минимум на 50%, а также контроля или искоренения инвазионных чужеродных видов для устранения или сокращения их воздействия с уделением особого внимания приоритетным видам и приоритетным объектам”.

Цель настоящего исследования – поиск ответов на следующие вопросы:

- а) каковы результаты инвентаризации инвазионных видов сосудистых растений, произрастающих в РФ?
- б) в чем заключаются особенности их географического распространения?
- в) какие действия в настоящее время предпринимаются в России для управления инвазионными видами растений?

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Территория исследований*

Российская Федерация – крупнейшее по площади государство мира (более 17 млн км<sup>2</sup>), расположенное в Северной Евразии. Ее территория имеет протяженность более 4000 км с севера на юг (между 81°51' и 41°11' с. ш.) и около 10000 км с запада на восток (между 19°38' в. д. и 169°0' з. д.). При этом более 11 млн км<sup>2</sup>, или 64% всей ее территории, расположено в зоне Севера. В административном отношении РФ включает 85 субъектов, которые объединены в 8 федеральных округов (ФО). Россия обладает широким спектром физико-географических условий, ее территорию охватывают арктический, субарктический и умеренный климатические пояса. В то же время флора сосудистых растений России не богата и представлена 12500 видами (Камелин, 2007).

### *Составление списка инвазионных видов растений*

Первый в России список инвазионных видов составлен для Северо-Запада России и насчитывает 22 таксона (Гельтман, 2003). В 2006 г. началась работа над проектом “Черная книга флоры

Средней России”, результатом которого стала монография, содержащая данные о 52 наиболее агрессивных и широко распространенных на территории Средней России инвазионных видах и “черный список” 100 чужеродных видов растений, требующих срочного изучения и мониторинга для дальнейшего предотвращения инвазий (Виноградова и др., 2006, 2010). Позднее разработаны методологические аспекты создания “Черных книг” и black-листов конкретных регионов с учетом уровня агрессивности инвазионных видов и особенностей их распространения, согласно четырем статусам инвазивности (Нотов и др., 2010), а также появились многочисленные black-листы для определенных территорий (Кравченко, 2007; Силаева, 2011; Антонова, 2012; Тремасова и др., 2012; Сагалаев, 2013; Стародубцева и др., 2014; Panasenko, 2014).

В 2015 г. Комиссией по инвазионным видам при Совете ботанических садов России предложено разработать объединенный список (black-лист) инвазионных растений России. В составлении этого списка приняли участие более 50 исследователей из 46 регионов страны (Виноградова и др., 2015).

Сведения об инвазионных растениях, произрастающих на территории России, можно найти в базе данных по чужеродным видам животных и растений России (Petrosyan et al., 2018). В 2018 г. издана книга “Самые опасные инвазивные виды России (ТОП-100)”, содержащая информацию о 100 растениях и животных, наиболее опасных для экосистем. Для каждого вида представлены оригинальные карты природных и инвазионных ареалов, инвазионные коридоры и векторы инвазии, особенности биологии, влияние на местные виды, экосистемы и человека, методы борьбы с численностью (Самые опасные..., 2018).

Следующим этапом в изучении инвазионной флоры России стал ее комплексный анализ, проведенный на данных из 45 субъектов РФ. В список вошли 354 инвазионных вида, однако их инвазионный статус был не учтен (Vinogradova et al., 2018).

В последние годы интерес к проблеме биологических инвазий возрос: вышли в свет “Черные книги флоры” Тверской обл. (Виноградова и др., 2011), Сибири (Эбель и др., 2016), Удмуртской Республики (Баранова и др., 2016), Калужской (Решетникова и др., 2019) и Нижегородской (Мининзон и др., 2020) обл., Дальнего Востока (Виноградова и др., 2021), Республики Башкортостан (Абрамова и др., 2021), Кабардино-Балкарской Республики (Шагапсоев и др., 2021), многочисленные списки инвазионных видов растений отдельных регионов (Приложение В). Это дало возможность пересмотреть и значительно расширить перечень инвазионных растений, произрастающих на территории страны.

Актуальный список инвазионной флоры РФ приведен в Приложении А к настоящей статье.

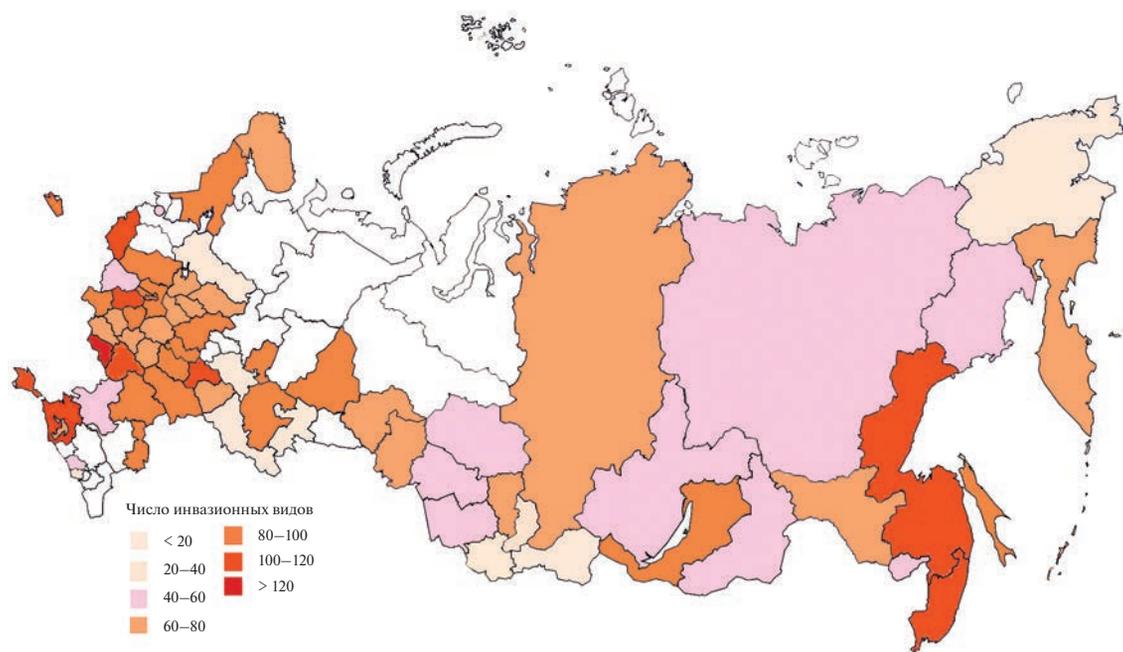


Рис. 1. Общая численность инвазивных видов растений в административных субъектах РФ.

Публикации, которые легли в основу списка, приведены в Приложении В. Для удобства использования источники сгруппированы по административным субъектам. Список видов сгруппирован по ФО и субъектам РФ. Данный подход позволяет систематизировать информацию в целях разработки эффективных мер государственного контроля расселения инвазивных видов.

Настоящим исследованием охвачены 65 субъектов РФ (81% территории страны): 5 субъектов Северо-Западного ФО, 17 субъектов Центрального ФО, 9 субъектов Приволжского ФО, 3 субъекта Уральского ФО, 7 субъектов Южного ФО, 3 субъекта Северо-Кавказского ФО, 10 субъектов Сибирского ФО и 11 субъектов Дальневосточного ФО (рис. 1, 2).

Таксономически близкие виды, идентификация которых сопряжена с определенными трудностями (*Reynoutria × bohemica*, *R. japonica*, *Elymus trachycaulus*, *E. novae-angliae*, *Helianthus tuberosus* s.l., виды родов *Symphotrichum* и др.), включены в список в их широком понимании. Это связано с тем, что борьба с такими видами должна входить в государственную политику в сфере охраны окружающей среды, а методы борьбы с этими близкородственными видами идентичны, вне зависимости, например, от строения обертки корзинки и от других мелких морфологических признаков.

Латинские названия растений и фамилии авторов таксонов приведены, в основном, согласно базе данных “Plants of the World Online”<sup>1</sup>. Распределение видов по семействам приводится соглас-

но классификации IV филогенетической группы покрытосеменных (APG et al., 2016).

#### Инвазивный статус

Распределение видов по категориям их инвазивного статуса традиционно производится в соответствии с оценкой уровня агрессивности таких видов и особенностей их распространения (Нотов и др., 2010). В зависимости от степени выраженности основных характеристик виды объединены в группы с разными статусами.

Статус 1 – виды-трансформеры, которые активно внедряются в естественные и полустественные (природно-антропогенные) сообщества, изменяют облик экосистем, нарушают сукцессионные связи, выступают в качестве эдификаторов и доминантов, образуя значительные по площади одновидовые заросли, вытесняют и (или) препятствуют возобновлению видов природной флоры.

Статус 2 – чужеродные виды, активно расселяющиеся и натурализующиеся в нарушенных полустественных и естественных местообитаниях.

Статус 3 – чужеродные виды, расселяющиеся и натурализующиеся в настоящее время в нарушенных местообитаниях, в ходе дальнейшей натурализации некоторые из них, по-видимому, смогут внедриться в полустественные и естественные сообщества.

Статус 4 – потенциально инвазивные виды, способные к возобновлению в местах заноса и

<sup>1</sup> <http://plantsoftheworldonline.org>

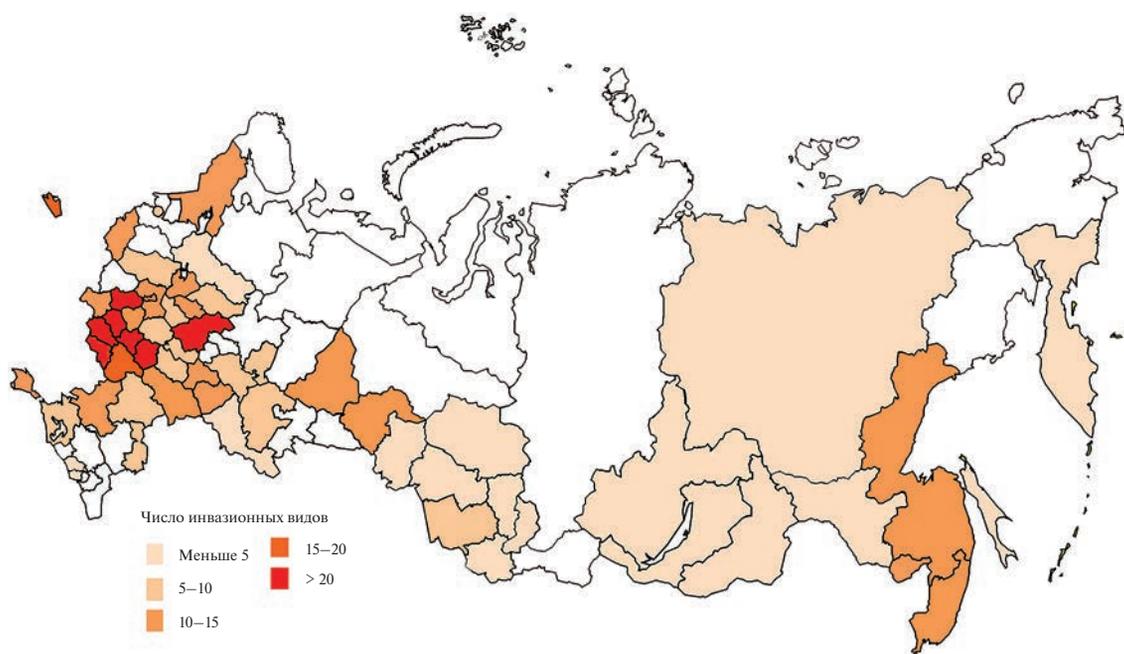


Рис. 2. Численность инвазивных видов растений со статусом 1 в административных субъектах РФ.

проявившие себя в смежных регионах в качестве инвазивных видов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Итоги инвентаризации

В настоящее время инвазивная флора России представлена 584 видами сосудистых растений из 87 семейств (Приложение А). Установлены наиболее распространенные вселенцы (по числу административных субъектов, в которых они зарегистрированы): *Acer negundo* (встречается в 60 субъектах из 65), *Echinocystis lobata* (57), *Erigeron canadensis* (54), *Impatiens glandulifera* (53), *Amaranthus retroflexus* (53), *Helianthus tuberosus* (52), *Lepidium densiflorum* (50), *Hordeum jubatum* (49), *Solidago canadensis* (49), *Matricaria discoidea* (48). Для сравнения, наиболее распространенные инвазивные растения мира: *Lantana camara*, *Calotropis procera*, *Pontederia crassipes* (*Eichhornia crassipes*), *Sonchus oleraceus*, *Leucaena leucocephala*, *Centaurea solstitialis*, *Acanthospermum hispidum*, *Galinsoga parviflora*, *Lonicera japonica*, *Cenchrus purpureus* (*Pennisetum purpureum*) (Pyšek et al., 2017). Список наиболее распространенных инвазивных растений мира составлен на материалах, содержащихся в Сборнике инвазивных видов CABI (CABI Invasive Species Compendium)<sup>2</sup>, в Глобальной базе данных по инвазивным видам (ISSG Global Invasive Species Database)<sup>3</sup> и в Базе данных “Инвазивные растения

<sup>2</sup> <http://www.cabi.org/isc>

<sup>3</sup> <http://www.iucngisd.org/gisd>

мира” (Weber, 2003). Этот список далеко не полный и не охватывает всего разнообразия инвазивных видов растений, поскольку не во всех регионах мира ведутся исследования и не во всех регионах выявлены инвазивные растения. Однако на сегодня это единственное аналитическое обобщение, выполненное в мировом масштабе.

Не все инвазивные виды, которые в России наиболее широко распространены, одновременно являются самыми агрессивными. Некоторые из таких видов, хотя и зарегистрированы в большинстве регионов, имеют низкий инвазивный статус. Тем не менее 1/5 инвазивных видов (107 из 584) имеет статус 1 (вид-трансформер) в каком-либо из ФО. Столь высокий показатель обращает внимание на необходимость неотложного контроля биологических инвазий на законодательном уровне. Единственный вид, зарегистрированный во всех ФО со статусом 1 (вид-трансформер), — *Elodea canadensis*. *Acer negundo* и *Echinocystis lobata* признаны видами-трансформерами в семи ФО. Еще пять видов инвазивных растений имеют статус 1 в шести ФО и два вида — в пяти ФО (табл. 1). Остальные виды-трансформеры распространены не столь широко (рис. 3).

Black-лист инвазивных видов России довольно лабилен и претерпевает изменения и дополнения: ежегодно появляются новые агрессивные чужеродные растения, изменяется инвазивный статус уже выявленных видов (чаще, к сожалению, в сторону повышения). Так, лишь недавно отмечено активное распространение *Cardamine occulta* по территории европейской части России (Леост-

**Таблица 1.** Наиболее распространенные и агрессивные виды инвазионной флоры России

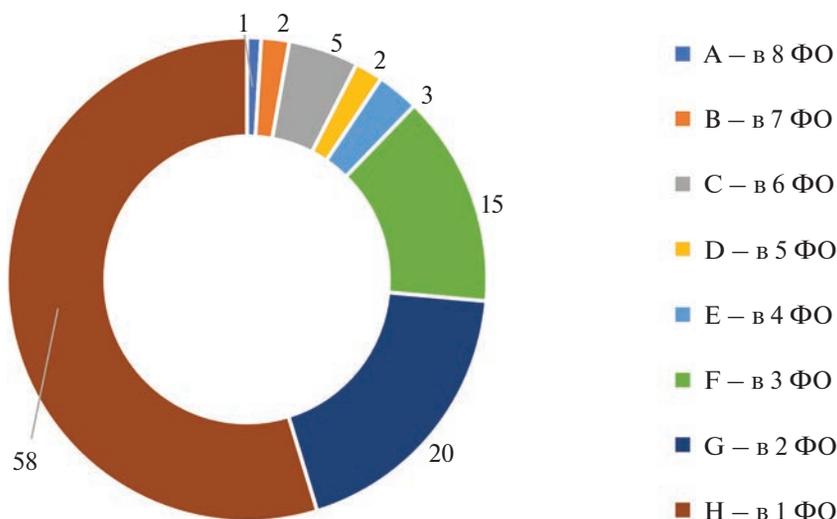
Вид (семейство)	Число субъектов РФ, в которых зарегистрирован вид	Число ФО, в которых зарегистрирован вид	Число ФО, где вид имеет статус 1	Первичный ареал
<i>Elodea canadensis</i> (Hydrocharitaceae)	45	8	8	Североамериканский
<i>Acer negundo</i> (Sapindaceae)	60	8	7	Североамериканский
<i>Echinocystis lobata</i> (Cucurbitaceae)	57	8	7	Североамериканский
<i>Solidago canadensis</i> (Asteraceae)	49	8	6	Североамериканский
<i>Bidens frondosa</i> (Asteraceae)	42	8	6	Североамериканский
<i>Erigeron canadensis</i> (Asteraceae)	54	8	6	Североамериканский
<i>Heracleum sosnowskyi</i> (Apiaceae)	40	7	6	Кавказский
<i>Lupinus polyphyllu</i> (Fabaceae)	43	7	6	Североамериканский
<i>Impatiens glandulifera</i> (Balsaminaceae)	53	8	5	Южноазиатский
<i>Erigeron annuus</i> (Asteraceae)	40	6	5	Североамериканский

рин, Майоров, 2019). Во многих регионах зарегистрированы инвазионные популяции *Thladiantha dubia* (Кулуев и др., 2019). В азиатской части России обнаружилась *Wolffia arrhiza*, которая успешно зимует и сформировала обширные заросли площадью сотни квадратных метров в пойменных водоемах р. Обь (Киприянова и др., 2021).

Имеющиеся в настоящее время данные позволяют проводить мониторинговые исследования биологических инвазий и чужеродных видов, однако высокая динамика инвазионного компонента определяет необходимость продолжения инвентаризационных работ, особенно в малоизученных регионах.

#### Особенности географического распространения

Видовое разнообразие инвазионных видов зависит от климатических условий, плотности населения и площади урбанизированной территории отдельных регионов (González-Moreno et al., 2014; Essl et al., 2019). Для территории России подобные закономерности еще не выявлены ввиду отсутствия единого списка инвазионных растений, однако ранее (Vinogradova et al., 2018) установлены существенные различия в представленности жизненных форм между Европейским, Сибирским и Дальневосточным биогеографическими районами, при этом на Дальнем Востоке преобладающими

**Рис. 3.** Число видов-трансформеров (наивысший инвазионный статус) по федеральным округам (ФО).

оказались многолетние травянистые растения, тогда как в европейской части России — кустарники.

Проведенное исследование позволило сделать вывод о том, что инвазионные виды сосудистых растений по федеральным округам распределены неравномерно. В Южном ФО отмечено 263 вида, в Северо-Западном — 229, в Центральном — 228, в Приволжском — 226, в Дальневосточном — 142, в Уральском — 134, в Сибирском — 116, в Северо-Кавказском — 66 видов (рис. 1, 2). Распределение видов по категориям инвазионного статуса для каждого ФО приведено в Приложении Б.

Наибольшее число инвазионных видов зарегистрировано в Белгородской обл. (125), Краснодарском (119) и Приморском (113) краях, Псковской обл. (113). Обращает на себя внимание тот факт, что в регионах с не самым высоким флористическим разнообразием зарегистрировано наибольшее число инвазионных видов. Вероятно, это можно объяснить тем, что составители списков придерживались рекомендаций европейских авторов по составлению списка 100 наиболее опасных чужеродных видов (Genovesi, Scalera, 2007). В то же время не все чужеродные виды растений инвазионны. Кроме того, не во всех регионах обнаруживается необходимое число инвазионных растений, а там, где все же список включает 100 видов, создается впечатление его некоторой искусственности (в такие списки включены виды-археофиты, которые хотя и в обилии встречаются в полустепенных местообитаниях, но имеют слабый инвазионный потенциал — например *Lactuca tatarica*, *Sisymbrium loeselii*, эфемерофиты, например *Euphorbia peplus*, или колонофиты).

По 17 административным субъектам списки инвазионных видов растений отсутствуют. Среди них и богатые во флористическом отношении регионы — Республики Дагестан и Ингушетия, Карачаево-Черкесская Республика, Ставропольский край, а также регионы с высокой антропогенной нагрузкой — Ленинградская обл. и Чувашская Республика. Еще для шести субъектов: Вологодской, Ростовской, Смоленской обл., а также хорошо изученных во флористическом отношении Республики Татарстан, Оренбургской и Челябинской обл. — данные фрагментарны.

#### *Вопросы управления инвазионными видами растений в России*

Поскольку распространение инвазионных видов растений отрицательно влияет на состояние окружающей среды, вопросам контроля их численности и расселения необходимо уделять особое внимание. Ранее предоблажен краткий обзор источников законодательного регулирования биологических инвазий в России (Senator, Rozenberg, 2017). К сожалению, приходится констатировать,

что до настоящего времени в России отсутствуют и законодательные акты, регулирующие политику в области инвазионных видов (исключение составляет правовое регулирование фитокарантина), и национальная стратегия по чужеродным видам. Более того, ни один из нормативных актов, касающихся чужеродных видов, не содержит ни толкования понятий: чужеродный вид, инвазионный чужеродный вид, биологическая инвазия, ни конкретных норм, посвященных контролю за ввозом, использованием и распространением на территории России чужеродных видов (Нецветова, 2022). Заметим, что законодательства, например, Республик Молдовы, Беларуси и Украины оперируют понятием “инвазивные чужеродные виды растений”, что соответствует установившейся международной практике в этой сфере (Тулина, 2019). Также следует отметить, что именно законодательные акты обеспечивают правовую основу для эффективного управления биологическими инвазиями (Тулина, 2019; Lodge et al., 2006; Vaquero et al., 2021). Важно подчеркнуть и то, что само отсутствие законов является обстоятельством, способствующим распространению инвазионных видов (Richardson et al., 2003).

Принятый 30.12.2020 г. Федеральный закон № 492-ФЗ “О биологической безопасности в Российской Федерации”, устанавливающий основы государственного регулирования в области обеспечения биологической безопасности в РФ и определяющий комплекс мер, направленных на защиту населения и охрану окружающей среды от воздействия опасных биологических факторов, на предотвращение биологических угроз, создание и развитие системы мониторинга биологических рисков, ориентирован на патогенные биологические агенты (микроорганизмы, вирусы, прионы, токсины) и не содержит сведений о чужеродных растениях. Подобное положение вызывает озабоченность, поскольку биологические инвазии в настоящее время рассматриваются как один из видов биологического загрязнения (Тулина, 2019).

В Стратегии и Планах действий по сохранению биологического разнообразия Российской Федерации (Стратегия и План..., 2014), предусматривающих реализацию мероприятий в 2015–2020 гг., в качестве одной из национальных целевых задач обозначены идентификация и ранжирование инвазионных чужеродных видов и путей их интродукции и распространения, а в отношении приоритетных видов — осуществление мер регулирования или искоренения. Для оценки выполнения данной задачи выделен следующий набор индикаторов:

а) общее число выявленных чужеродных видов с разбивкой по основным таксономическим группам и средам обитания;

б) доля выявленных чужеродных видов (% к общему числу видов фауны и флоры);

в) общее число выявленных инвазионных чужеродных видов с разбивкой по основным таксономическим группам и средам обитания;

г) доля выявленных инвазионных чужеродных видов (% к общему числу выявленных чужеродных видов);

д) доля выявленных инвазионных чужеродных видов, в отношении которых осуществляются меры регулирования и искоренения (% к общему числу выявленных инвазионных чужеродных видов);

е) доля инвазионных коридоров, на которых установлен контроль и осуществляются меры регулирования интродукции чужеродных видов.

Приходится констатировать, что поставленные задачи, в частности пункты “а” и “б”, реализованы не полностью. Разработка общего списка чужеродных видов растений затруднена (Виноградова и др., 2015), во-первых, в связи с таксономическими разногласиями в трактовке объема и номенклатуры ряда таксонов. Во-вторых, один и тот же таксон может быть аборигенным в европейской части страны и чужеродным – в азиатской, или наоборот. Списки чужеродных видов локальных территорий составлены для регионов, охватывающих около 80% площади страны (Vinoградова et al., 2021). По опубликованным данным, в настоящее время в России произрастает 1203 чужеродных вида растений (Essl et al., 2019). Это сильно заниженная цифра, поскольку только в Московском регионе разнообразие чужеродных растений составляет 1354 вида (Майоров и др., 2020). Если принять во внимание тот факт, что на всех континентах, за исключением Антарктиды, численность натурализовавшихся видов колеблется в пределах от 2000 до 3500 (Rušek et al., 2017), а также гипотезу о том, что на континентах чужеродными являются более 20% видов растений (Rejmanek, Randall, 1994; Dogra et al., 2010), по нашим оценкам, для России этот показатель составляет не менее 3000 видов.

Что касается инвазионных видов, то задачи, сформулированные в пунктах “в”, “г”, “д” выполнены (данная статья как раз и свидетельствует об этом). По данным из 64 регионов страны, выявлено 584 инвазионных вида растений, что составляет около 10% от численности чужеродных видов. Тем не менее, ежегодно в России фиксируются новые инвазионные виды, так что мониторинг их расселения необходимо не только продолжать, но и усиливать. Кроме того, крайне низка доля (не более 1%!) инвазионных чужеродных видов, в отношении которых осуществляются меры регулирования и искоренения. Примерами таких видов могут служить *Acer negundo* (Nikolaeva et al., 2020) и *Heraclium sosnowskyi* (Кудрявцева и др., 2009).

Относительно пункта “е” следует сказать, что перечень инвазионных коридоров (векторов инвазии) чужеродных видов растений разработан, но регулирование численности чужеродных рас-

тений проводится в полной мере лишь на сельскохозяйственных землях и обочинах авто- и железнодорожных магистралей (в рамках общей борьбы с сорняками). Осуществление мер регулирования интродукции чужеродных видов проводится в настоящее время только в ботанических садах. В этой связи важным шагом стало издание Кодекса управления инвазионными чужеродными видами растений в ботанических садах стран СНГ (Кодекс..., 2015), разработанного Комиссией по инвазионным видам растений, действующей при Совете ботанических садов стран СНГ при МААН.

Здесь следует подчеркнуть существенный вклад в изучение инвазионных видов растений и выявление способов борьбы с ними научно-исследовательских институтов, в том числе ботанических садов. Как правило, именно сотрудниками этих организаций проводится идентификация и инвентаризация инвазионных видов, выявление источников заноса и мест обитания, изучение взаимодействия с аборигенными видами. Результаты этих работ способствуют пониманию особенностей натурализации, размножения и распространения инвазионных видов, оценке их воздействия на аборигенные виды и эффективности примененных методов борьбы.

Стоит заметить, что эффективное управление биологическими инвазиями может работать в том случае, если широкая общественность осведомлена о неблагоприятных последствиях биологических инвазий. Учитывая, что количество специалистов всегда ограничено, необходимо принимать во внимание роль широких слоев населения (и прежде всего научных волонтеров) в управлении инвазионными видами. Недавнее исследование (Эбель, 2021) продемонстрировало, как данные “гражданской науки” могут быть полезны для восполнения пробелов в знаниях о распространении инвазионных видов растений. Всего за 2.5 года в проекте “Инвазивные растения Сибири”, организованном на платформе iNaturalist, собрано около 12 тыс. записей о 98 инвазионных и потенциально инвазионных видах растений, загруженных более чем 800 наблюдателями (Эбель, 2021). В России существуют общественные движения, занимающиеся проблемой вторжения вида *Heraclium sosnowskyi*, – “БорщеВиктори”, “Антиборщевик” и др. Проблема вторжения борщевика Сосновского, являясь социально значимой, вызывает большой отклик у населения, поэтому многие люди участвуют как в проектах “гражданской науки”, направленных на сбор сведений о борщевике Сосновского, так и в непосредственном контроле этого вида. Опыт, накопленный такими общественными движениями, можно применять для вовлечения добровольцев в контроль других инвазионных видов (Шайкина и др., 2022). Эти и подобные проекты, связанные с ранним обнаружением инвазионных видов, приобретают существенное

значение по причине того, что предотвратить занос инвазионных видов практически невозможно.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время на значительной территории Земли преобладают измененные антропогенным воздействием экосистемы, которые зачастую содержат большое число чужеродных видов (Vitousek et al., 1987). Не является исключением и Россия, где, по аналитическим оценкам, произрастает 3000 чужеродных видов сосудистых растений. При этом, несмотря на интенсивные исследования, направленные на моделирование потенциальных изменений в распределении организмов вследствие изменения климата и антропогенной нагрузки, все еще существует большая неопределенность в прогнозах того, какие виды будут осваивать новые регионы и места обитания и каковы будут последствия их вторжения (Rušek et al., 2020).

В нашей статье содержится наиболее полный список инвазионных видов сосудистых растений, произрастающих на территории РФ (Приложение А) с их распределением по категориям инвазионного статуса для каждого федерального округа (Приложение Б). Этот список вносит мощный вклад в исследования инвазий, а также служит основой для управления инвазионными видами и для регулирования природоохранной деятельности. Заметим, что информации о распространении и численности инвазионных видов растений в России по-прежнему недостаточно, поэтому сбор данных о численности и размерах популяций и, по возможности, мониторинг динамики чужеродных видов могут сформировать основу для прогнозирования их распространения и для разработки и успешной реализации стратегии управления инвазионными видами.

Отсутствие внимания к проблеме инвазионных видов может привести к значительным социально-экономическим последствиям и нанести непоправимый ущерб экосистемам. В связи с этим крайне важным является решение вопроса о биологических инвазиях на государственном уровне и, прежде всего, разработка национальной стратегии по чужеродным видам и законодательных актов, регулирующих политику в области инвазионных видов. Другими важными шагами должны стать разработка единых критериев описания популяций инвазионных видов и их мониторинга, а также повышение осведомленности населения о характере и последствиях воздействия инвазионных видов.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания ГБС РАН «Инвазионные растения России: инвентаризация, биоморфологические особенности и эффективные методы контроля расселения» № 122042600141-3.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит исследований с участием животных в экспериментах, выполненных кем-либо из авторов.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Онлайн версия содержит дополнительные материалы, доступные по адресу <https://doi.org/10.31857/S0042132423040099>.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамова Л.М., Голованов Я.М., Мулдашев А.А.* Черная книга флоры Республики Башкортостан. М.: КМК, 2021. 175 с.
- Антонова Л.А.* Инвазионный компонент флоры Хабаровского края // Рос. журн. биол. инвазий. 2012. Т. 5. № 4. С. 2–9.
- Баранова О.Г., Бралгина Е.Н., Колдомова Е.А. и др.* Черная книга флоры Удмуртской Республики / Ред. О.Г. Баранова. М., Ижевск: Ин-т компьютерных исследований, 2016. 67 с.
- Баранова О.Г., Щербаков А.В., Сенатор С.А. и др.* Основные термины и понятия, используемые при изучении чужеродной и синантропной флоры // Фиторазнообразие Восточной Европы. 2018. Т. XII (4). С. 4–22. <https://doi.org/10.24411/2072-8816-2018-10031>
- Виноградова Ю.К., Майоров С.Р., Хорун Л.В.* Первые итоги реализации проекта “Черная книга” Средней России // Флористические исследования в Средней России / Мат. VI науч. совещ. по флоре Сред. России (Тверь, 15–16 апреля 2006 г.). М.: КМК, 2006. С. 45–48.
- Виноградова Ю.К., Майоров С.Р., Хорун Л.В.* Черная книга флоры Средней России. М.: ГЕОС, 2010. 512 с.
- Виноградова Ю.К., Майоров С.Р., Нотов А.А.* Черная книга флоры Тверской области: чужеродные виды растений в экосистемах Тверского региона. М.: КМК, 2011. 292 с.
- Виноградова Ю.К., Абрамова Л.М., Акатова Т.В. и др.* “Черная сотня” инвазионных растений России // Инф. бюл. Совета бот. садов стран СНГ при Междунар. ассоц. акад. наук. 2015. Вып. 4 (27). С. 85–89.
- Виноградова Ю.К., Антонова Л.А., Дарман Г.Ф. и др.* Черная книга флоры Дальнего Востока: инвазионные виды растений в экосистемах Дальневосточного федерального округа. М.: КМК, 2021. 510 с.
- Гельтман Д.В.* Понятие “инвазивный вид” и необходимость изучения этого явления // Проблемы изучения адвентивной и синантропной флоры в регионах СНГ / Мат. науч. конф. (Тула, 15–17 мая 2003 г.). М.: МГУ, 2003. С. 35–36.
- Камелин Р.В.* Проект “Флора России” (Российской Федерации) // Вестн. РАН. 2007. Т. 77. № 1. С. 22–26.
- Киприянова Л.М., Прийдак Н.В., Костерин О.Э.* Находка вольфии бескорневой *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel

- ex Wimm. в Новосибирской области (Западная Сибирь) – первая в Азиатской России // Рос. журн. биол. инвазий. 2021. Т. 14 (2). С. 56–62.
- Кравченко А.В. Конспект флоры Карелии. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 403 с.
- Кудрявцева Е.Н., Феофанова М.А., Веролайн М.В., Баранова Н.В. Химические методы борьбы с борщевиком Сосновского с использованием гербицидов Ленок и Анкор-85 // Вестн. Твер. гос. унив. Сер. Биол. Экол. 2009. № 16. С. 56–61.
- Кулуев Б.Р., Швец Д.Ю., Голованов Я.М., Пробатова Н.С. Гладианта сомнительная (*Thladiantha dubia*, Cuscutaceae) в Башкортостане – опасный сорняк с высоким инвазионным потенциалом // Рос. журн. биол. инвазий. 2019. Т. 12 (1). С. 66–78.
- Кодекс управления инвазионными чужеродными видами растений в ботанических садах стран СНГ. М.: ГБС РАН, 2015. 68 с.
- Леострин А.В., Майоров С.Р. *Cardamine occulta* Hornem. (Brassicaceae) во флоре Европейской России: инвазионный статус и распространение // Рос. журн. биол. инвазий. 2019. Т. 12 (2). С. 52–63.
- Майоров С.Р., Алексеев Ю.Е., Бочкин В.Д. и др. Чужеродная флора Московского региона: состав, происхождение и пути формирования. М.: КМК, 2020. 576 с.
- Мининзон И.Л., Соловьев А.А., Тростина О.В. Черная книга флоры Нижегородской области: чужеродные виды растений, заносные и культивируемые, активно натурализующиеся в условиях Нижегородской области. Нижний Новгород, 2020. 70 с.
- Нецветова Е.В. О необходимости юридического закрепления в РФ понятий, используемых по поводу отношений, связанных с инвазивными чужеродными видами // Охрана и рациональное использование животных и растительных ресурсов / Мат. нац. конф. с междунар. уч. в рамках XI Междунар. науч.-практ. конф. “Климат, экология, сельское хозяйство Евразии” (Молодежный, 25–29 мая 2022 г.). Молодежный: ИГАУ, 2022. С. 92–99.
- Нотов А.А., Виноградова Ю.К., Майров С.Р. О проблеме разработки и ведения региональных Черных книг // Рос. журн. биол. инвазий. 2010. № 4. С. 54–86.
- Предлагаемые основные индикаторы механизма мониторинга для Глобальной рамочной программы в области биоразнообразия на период после 2020 года. 2021. Электронный ресурс. <https://www.cbd.int/doc/c/b6e5/72cb/6288a66de0436e5456620727/wg2020-03-03-add1-ru.pdf>
- Решетникова Н.М., Майоров С.Р., Крылов А.В. Черная книга Калужской области. Сосудистые растения. Калуга: Ваш Домъ, 2019. 342 с.
- Сагалаев В.А. К инвентаризации инвазивных видов флоры Волгоградской области // Вестн. Твер. гос. унив. Сер. Биол. Экол. 2013. № 32. С. 102–105.
- Самые опасные инвазионные виды России (ТОП-100) / Ред. Ю.Ю. Дгебуадзе, В.Г. Петросян, Л.А. Хляп. М.: КМК, 2018. 688 с.
- Силаева Т.Б. Чужеродные виды флоры в бассейне реки Суры // Рос. журн. биол. инвазий. 2011. Т. 4 (3). С. 15–23.
- Стародубцева Е.А., Морозова О.В., Григорьевская А.Я. Материалы к “Черной книге Воронежской области” // Рос. журн. биол. инвазий. 2014. Т. 7 (2). С. 133–149.
- Стратегия и План действий по сохранению биологического разнообразия Российской Федерации. М.: Министерство природных ресурсов и экологии, 2014. 275 с.
- Тремасова Н.А., Борисова Е.А., Борисова М.А. Инвазивные виды растений Ярославской области // Ярослав. пед. вест. 2012. № 1. Т. III (Ест. науки). С. 103–111.
- Тулина Э.Е. Правовое регулирование инвазивных чужеродных видов растений по законодательству Молдовы, Беларуси и Украины (сравнительный анализ) // *Legea și Viața*. 2019. № 1/2 (325). Р. 126–130.
- Шайкина М.Н., Шипилина Л.Ю., Гладилин А.А. и др. Подходы к вовлечению добровольцев в решение проблемы фитоинвазий // Фитоинвазии: остановить нельзя сдаться / Мат. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. уч. (Москва, 10–11 февраля 2022 г.). М.: МГУ, 2022. С. 463–468.
- Шхагапсоев С.Х., Чадаева В.А., Шхагапсоева К.А. Черная книга флоры Кабардино-Балкарской Республики. Нальчик: Изд. М. и К. Котляровых, 2021. 200 с.
- Эбель А.Л. Роль “гражданской науки” в изучении инвазивных растений Сибири // Проблемы промышленной ботаники индустриально развитых регионов / Мат. VI Междунар. конф. (Кемерово, 5–7 октября 2021 г.). Кемерово, 2021. С. 28–29.
- Эбель А.Л., Куприянов А.Н., Стрельникова Т.О. и др. Черная книга флоры Сибири / Ред. А.Н. Куприянов. Новосибирск: Гео, 2016. 440 с.
- Baquero R.A., Ayllón D., Nicola G.G. Are the EU biosecurity legislative frameworks sufficiently effective to prevent biological invasions in the Natura 2000 network? – A case study in Mediterranean Europe // *Environ. Sci. Policy*. 2021. V. 120. P. 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2021.02.007>
- Blackburn T.M., Bellard C., Ricciardi A. Alien versus native species as drivers of recent extinctions // *Front. Ecol. Environ.* 2019. V. 17. P. 203–207. <https://doi.org/10.1002/fee.2020>
- Chase M.W., Christenhusz M.J.M., Fay M.F. et al. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV // *Bot. J. Linn. Soc.* 2016. V. 181 (1). P. 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Dawson W., Moser D., van Kleunen M. et al. Global hotspots and correlates of alien species richness across taxonomic groups // *Nat. Ecol. Evol.* 2017. V. 1. P. 0186. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0186>
- Dogra K.S., Sood S.K., Dobhal P.K., Sharma S. Alien plant invasion and their impact on indigenous species diversity at global scale: a review // *J. Ecol. Nat. Environ.* 2010. V. 2 (9). P. 175–186.
- Essl F., Dawson W., Kreft H. et al. Drivers of the relative richness of naturalized and invasive plant species on Earth // *AoB Plants*. 2019. V. 11 (5). P. 1–13. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plz051>
- The state of the world’s plants report 2016. Royal Botanic Gardens, Kew, 2016.
- Genovesi P., Scalera R. Towards a black list of invasive alien species entering Europe through trade, and proposed

- responses // Convention on the conservation of European wildlife and natural habitats, 2007 / Standing Committee 27th Meeting (Strasbourg, 26–29 November 2007). Strasbourg, 2007. 40 p.
- González-Moreno P., Diez J.M., Ibáñez I. et al. Plant invasions are context-dependent: multiscale effects of climate, human activity and habitat // *Diver. Distribut.* 2014. V. 20. P. 720–731.
- Lambdon Ph.W., Pyšek P., Basnou C. et al. Alien flora of Europe: species diversity, temporal trends, geographical patterns and research needs // *Preslia*. 2008. V. 80. P. 101–149.
- Lodge D.M., Williams S.L., MacIsaac H.J. et al. Biological invasions: recommendations for U.S. policy and management // *Ecol. Appl.* 2006. V. 16 (6). P. 2035–2054. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2006\)016\[2035:bir-fup\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2006)016[2035:bir-fup]2.0.co;2)
- Nikolaeva A.A., Golosova E.V., Shelepova O.V. Methods of combating *Acer negundo* L. in specially protected natural areas // *BIO Web Conf.* 2020. V. 24. Iss. 00063. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202400063>
- Panasenko N.N. Blacklist of flora of Bryansk oblast // *Russ. J. Biol. Invasions*. 2014. V. 5. P. 203–205.
- Petrosyan V.G., Khlyap L.A., Reshetnikov A.N. et al. Alien species in the Holarctic // *Russ. J. Biol. Invasions*. 2018. V. 9. P. 374–381.
- Pyšek P. On the terminology used in plant invasion studies // *Plant invasions: general aspects and special problems* / Eds P. Pyšek, K. Prach, M. Rejmánek, M. Wade. Amsterdam: SPB Acad. Publ., 1995. P. 71–81.
- Pyšek P., Pergl J., Essl F. et al. Naturalized alien flora of the world: species diversity, taxonomic and phylogenetic patterns, geographic distribution and global hotspots of plant invasion // *Preslia*. 2017. V. 89. P. 203–274. <https://doi.org/10.23855/preslia.2017.203>
- Pyšek P., Hulme P.E., Simberloff D. et al. Scientists' warning on invasive alien species // *Biol. Rev.* 2020. V. 95. P. 1511–1534. <https://doi.org/10.1111/brv.12627>
- Rejmanek M., Randall J.M. Invasive alien plants in California: 1993 summary and comparison with other areas in North America // *Madroño*. 1994. V. 41. P. 161–177.
- Richardson D.M., Cambray J.A., Chapman R.A. et al. Vectors and pathways of biological invasions in South Africa – past, present, and future. Ch. 12 // *Pathways of invasions: strategies for management across space and time* / Eds G.M. Ruiz, J.T. Carlton. Washington: Island Press, 2003. P. 292–349.
- Richardson D.M., Pyšek P., Carlton J.T. A compendium of essential concepts and terminology in invasion ecology // *Fifty years of invasion ecology: the legacy of Charles Elton* / Ed. D.M. Richardson. Oxford: Wiley-Blackwell Publ., 2011. P. 409–420.
- Senator S.A., Rozenberg A.G. Assessment of economic and environmental impact of invasive plant species // *Biol. Bull. Rev.* 2017. V. 7 (4). P. 273–278. <https://doi.org/10.1134/S2079086417040089>
- van Kleunen M., Dawson W., Ess F. et al. The global naturalized alien flora (GloNAF) database // *Ecology*. 2019. V. 100. P. e02542. <https://doi.org/10.1002/ecy.2542>
- Vinogradova Y., Pergl J., Essl F. et al. Invasive alien plants of Russia: insights from regional inventories // *Biol. Invasions*. 2018. V. 20. P. 1931–1943. <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1686-3>
- Vinogradova Y.K., Tokhtar V.K., Notov A.A. et al. Plant invasion research in Russia: basic projects and scientific fields // *Plants*. 2021. V. 10 (7). P. 1477. <https://doi.org/10.3390/plants10071477>
- Vitousek P.M., Loope L.L., Stone C.P. Introduced species in Hawaii: biological effects and opportunities for ecological research // *Trends Ecol. Evol.* 1987. V. 2. P. 224–227.
- Weber E. Invasive plant species of the world: a reference guide to environmental weeds. Wallingford: CABI Publ., 2003. 548 p.

## Invasive Plants of Russia: Inventory Results, Distribution Features and Management Issues

S. A. Senator<sup>a</sup>, \* and Yu. K. Vinogradova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Tsitsin Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

\*e-mail: stsensator@yandex.ru

Globalization, expansion of trade relations, inter- and intra-continental population movements, development of transport links between countries have led to the active settlement of many plant species outside their natural ranges. Among such plants, a group of invasive species stands out, whose distribution has serious environmental, economic and social consequences. The article contains information about the results of the inventory of invasive vascular plant species growing in the Russian Federation, as well as an overview of the actions taken in the country to manage invasive plant species. Currently, there are 584 invasive species of vascular plants in Russia, of which the most common are *Acer negundo*, *Echinocystis lobata* and *Erigeron canadensis*. It has to be stated that until now there are no legislative acts regulating the policy in the field of invasive species (the exception is the legal regulation of phytocarinant), as well as the national strategy for alien species in Russia. Effective management of biological invasions can work if the general public is aware of the adverse effects of biological invasions. Given that the number of specialists is always limited, it is necessary to take into account the role of the general population in the management of invasive species.

**Keywords:** alien species, biological invasions, global changes, Russian Federation

УДК 631.46:631.48:930.26

## МИКРОБНАЯ БИОМАССА И ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ЦЕЛИННЫХ И ПАХОТНЫХ ПОЧВ КАК ПОКАЗАТЕЛИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ

© 2023 г. Е. В. Чернышева<sup>1</sup>, \*, К. С. Дуцанова<sup>1</sup>, Т. Э. Хомутова<sup>1</sup>, А. В. Борисов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения, Пушкино, Россия

\*e-mail: e.chernyusheva@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.03.2023 г.

После доработки 11.04.2023 г.

Принята к публикации 11.04.2023 г.

Проведено исследование биомассы и ферментативной активности почв естественных и антропогенно преобразованных экосистем. Исследованы катены целинных серых почв и черноземов запovedника “Белогорье” и катены пахотных почв в однотипных геоморфологических и литологических условиях. Изучена активность ферментов, участвующих в циклах углерода ( $\beta$ -глюкозидаза и ксилозидаза), азота (хитиназа) и фосфора (кислая и щелочная фосфатаза). Установлено, что уменьшение микробной биомассы почв в результате распашки не сопровождается эквивалентным уменьшением ферментативной активности почвы. Выявленная специфика ферментативной активности почв разных типов указывает на различия в структуре микробного сообщества почв и фитоценоза. Определены закономерности изменений ферментативной активности почв на водораздельных участках, в транзитной и аккумулятивной частях катен. Рассчитаны значения удельной, то есть приведенной к единице микробной биомассы, активности ферментов. Полученные закономерности изменения удельной ферментативной активности пахотных почв свидетельствуют о том, что, несмотря на потерю органического вещества и на уменьшение микробной биомассы в результате распашки, физиологическая эффективность микробного сообщества агрочернозема выше, чем в целинной почве. Высокая удельная ферментативная активность в пахотных почвах обусловлена большей скоростью продуцирования ферментов при смене режима землепользования.

**Ключевые слова:** органическое вещество, микробные сообщества, фосфатаза,  $\beta$ -глюкозидаза, хитиназа, ксилозидаза, сельскохозяйственное освоение

**DOI:** 10.31857/S0042132423040051, **EDN:** DHC FMW

### ВВЕДЕНИЕ

Ферменты катализируют почвенные биохимические процессы и круговорот основных биогенных элементов и рассматриваются в качестве ранних индикаторов изменений режима землепользования (Хазиев, 1982; Собина и др., 2022; Wang Q., Wang S., 2011; Burns et al., 2013; Cui et al., 2019; Rosinger et al., 2019). Оценку активности ферментов  $\beta$ -глюкозидазы (БГ), хитиназы (ХТ) и фосфатазы традиционно используют для изучения циклов углерода, азота и фосфора в почвах (Stott et al., 2010; Tischer et al., 2015). Кроме того, по активности вышеупомянутых ферментов можно судить о нарушении доступности основных питательных элементов для микробного сообщества (Sinsabaugh, Moorhead, 1994). Гидролитический фермент  $\beta$ -глюкозидаза, играющий ключевую роль в деградации целлюлозы, — индикатор изменений состояния почвенного органического вещества (Stott et al., 2010). Хитиназа, ответственная за гидро-

лиз грибного хитина и бактериального пептогликана, которые связаны с разрушением и оборачиваемостью органического вещества в почвах, — важный посредник в цикле азота и углерода в почвах (Tischer et al., 2015). Фосфатазы участвуют в минерализации фосфорорганических соединений. В зависимости от реакции почвенной среды выделяют кислую и щелочную фосфатазу (КФ и ЩФ), которые продуцируются многими грибами, бактериями, а также корнями растений (Nannipieri et al., 2011).

Внеклеточные ферменты иммобилизованы в почве в составе соединений органоминеральной природы (Burns et al., 2013), следовательно, их активность будет зависеть от основных почвенных характеристик, а также от состава растительности и типа землепользования, что не позволяет судить о ферментативной активности исключительно как о результате непосредственной деятельности почвенных микроорганизмов. Поэтому особую важность

приобретает изучение удельной ферментативной активности почв — отношения активности ферментов к единице микробной биомассы (Silva et al., 2019). В зарубежной литературе часто используется термин *specific enzymatic activity* (De Medeiros et al., 2015). Показано, что удельная ферментативная активность — при смене характера землепользования более чувствительная характеристика, по сравнению с ферментативной активностью, выраженной на массу почвы (Raiesi, Beheshti, 2014). Оценка удельной ферментативной активности, которая является показателем деятельности почвенных микроорганизмов, имеет ряд преимуществ, по сравнению с оценкой ферментативной активности на единицу массы почвы. Как правило, ферментативная активность уменьшается в результате распашки почв, что связано с уменьшением содержания органического углерода и микробиологической активности (Guan et al., 2022). Удельная ферментативная активность, напротив, может увеличиваться в пахотных почвах. Показано, что при распашке лесной почвы происходит увеличение ферментативной активности на единицу микробной биомассы (De Medeiros et al., 2015). Высокая ферментативная активность на единицу микробной биомассы в пахотных почвах может быть связана с изменением структуры микробного сообщества (Kivlin, Treseder, 2014), с уменьшением величины микробной биомассы, с увеличением скорости продуцирования ферментов микроорганизмами при обработке почв (De Medeiros et al., 2015), с большей доступностью питательных элементов или более быстрой оборачиваемостью микробной биомассы, что приводит к большей скорости синтеза новых ферментов (Beheshti et al., 2012; Raiesi, Beheshti, 2014). Вероятно, высокие значения удельной активности ферментов, несмотря на уменьшение содержания органического углерода и микробной биомассы в результате сельскохозяйственного освоения, отражают физиологическое состояние микробного сообщества и его большую метаболическую активность (Lagomarsino et al., 2011).

Распашка приводит к изменению эрозионно-аккумулятивных процессов в почвах, что может усиливать либо, напротив, уменьшать уже существующие неоднородности ферментативной активности на разных элементах рельефа. Поэтому получить полное представление о ферментативной активности почв можно только анализируя почвы в разных геоморфологических позициях в пределах одного склона. Топографическое положение определяет особенности поступления солнечной радиации и интенсивность гравитационных процессов в разных частях склона, что, в свою очередь, влияет на поступление и разложение в почве растительных остатков. Это может существенным образом влиять на содержание органического вещества и на структуру микробных сообществ, опре-

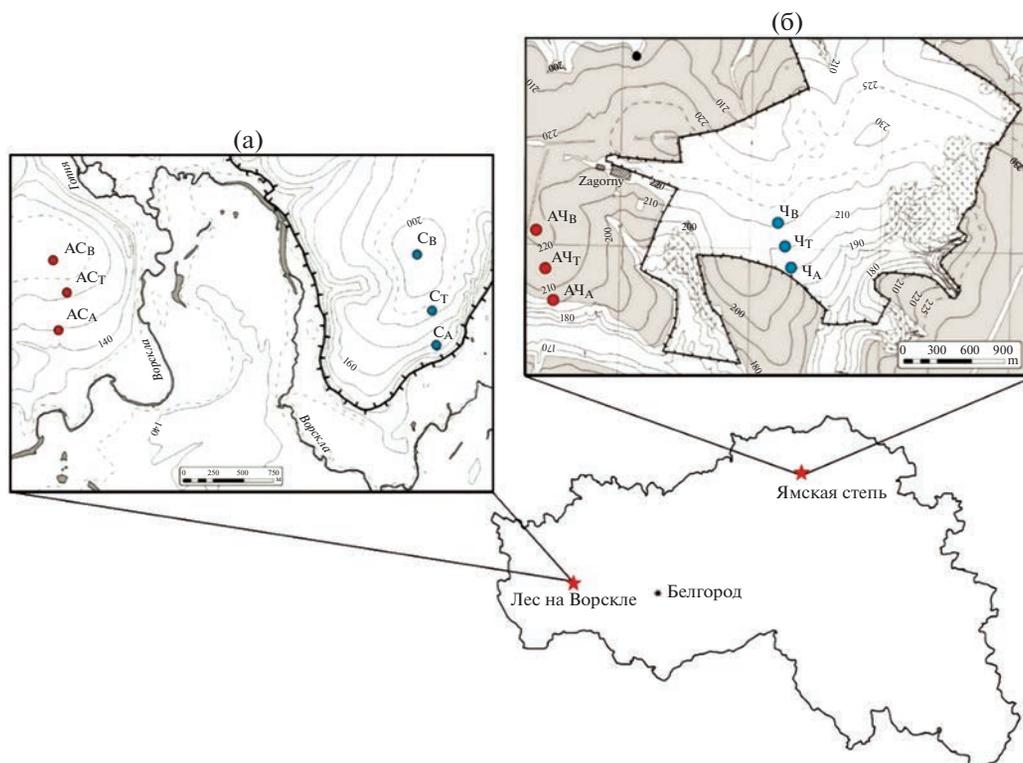
деляя таким образом и ферментативную активность почв. В ряде исследований показана зависимость ферментативной активности от топографического положения (Bergstrom et al., 1998; Dengiz et al., 2007; Marinari, Antisari, 2010; Wickings et al., 2016; Wang et al., 2022), однако результаты весьма противоречивы. Например, в одном исследовании выявлено, что активность ХТ и БГ выше в почве аккумулятивной части склона (Wickings et al., 2016), тогда как в другом исследовании активность этих ферментов максимальна в почвах водораздела и в транзитной зоне (Wang et al., 2022).

Цель данной работы — оценка влияния сельскохозяйственного использования территории на микробную биомассу почв и выявление изменений ферментативной активности серых почв и черноземов при распашке. Иными словами, мы предприняли попытку оценить биологическое истощение пахотных почв. В отличие от физического истощения, выпаханности и связанного с этим критического состояния почв, в плане обеспеченности элементами минерального питания растений, биологическое истощение представляет собой более сложный и нелинейный процесс, связанный с асинхронным уменьшением микробной биомассы и активности ферментов вследствие изменения физико-химических свойств почв и отторжения больших объемов растительного материала. При этом данные процессы будут протекать по-разному в зависимости от типа почвы и геоморфологических условий. В качестве рабочей гипотезы мы предполагали, что ферментативная активность будет определяться в большей степени типом почв и, следовательно, содержанием органического вещества, при этом положение в катене будет иметь значение лишь для пахотных почв. Также предполагалось, что сельскохозяйственное освоение приведет к увеличению ферментативной активности на единицу микробной биомассы при распашке как лесных, так и степных почв.

## ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Район исследования расположен на юге Среднерусской возвышенности (Белгородская обл.). Рельеф типично эрозионный, овражно-балочный. Территория принадлежит Донскому и Днепровскому бассейнам. Глубина залегания грунтовых вод на разных участках колеблется от 3 до 30 м. Преобладающие почвообразующие породы — карбонатные лёссовидные отложения.

В качестве объектов исследования были выбраны целинные почвы заповедника “Белогорье” и почвы современной пашни, расположенные рядом с заповедником. Следует отметить, что почвы заповедника достаточно глубоко исследованы (Счастливая, Касаткина, 2006; Касаткина и др., 2012; Русаков, 2012; Украинский, Щербаков, 2014; Мостовая и др., 2015), что позволило нам, опираясь на



**Рис. 1.** Расположение ключевых участков. Точки отбора почвенных образцов: (а) ключевой участок “Лес на Ворскле”, (б) ключевой участок “Ямская степь”. С – серые целинные, АС – агросерые, Ч – черноземы целинные, АЧ – агрочерноземы. Малые индексы: В – водораздел, Т – транзитная зона, А – аккумулятивная зона.

эти работы, выбрать наиболее репрезентативные и хорошо изученные участки. На территории ключевого участка “Лес на Ворскле” исследованы серые почвы под дубравой. На территории ключевого участка “Ямская степь” исследованы черноземы обыкновенные под разнотравно-злаковыми растительными ассоциациями. Пахотные аналогии целинных почв выбирали на участках со схожими уклоном и экспозицией склона и на однотипных почвообразующих породах. Длительность распашки и в том, и в другом случае одинакова и составляет около 100 лет. На момент отбора образцов (вторая декада мая) поля были заняты озимой пшеницей. Таким образом, соблюден принцип одного различия, что позволяет рассматривать антропогенную деятельность как единственный фактор, объясняющий возможные изменения химических свойств и ферментативной активности почв.

Участок “Лес на Ворскле” (рис. 1а) с трех сторон ограничивают рр. Ворскла, Готня и Локня. Территория характеризуется эрозионным типом рельефа. Среднегодовая температура составляет +6.0°C. Среднеголетняя сумма осадков 530 мм/г. Растительность представлена многолетней нагорной дубравой *Quercus robur*. Состав подлеска: бересклет европейский *Euonymus europaeus*, бересклет бородавчатый *Euonymus verrucosus*, клен полевой *Acer campestre*.

Участок “Ямская степь” (рис. 1б) имеет менее выраженное эрозионное расчленение. В рельефе преобладают выпуклые и вогнутые формы склонов. С запада на восток Ямскую степь пересекает водораздел двух притоков р. Оскол – рек Дубенка и Чуфичка. Средняя годовая температура воздуха несколько выше, чем на участке “Лес на Ворскле”, и составляет +6.9°C. Среднеголетняя сумма осадков 589 мм/г. В растительном покрове доминирует ассоциация *Stipa pennata* + *Poa angustifolia* + *Varioherbosa prato-steppae* (Игнатенко, Собакинский, 1983).

Для изучения ферментативной активности пахотных и целинных серых лесных почв ключевого участка “Лес на Ворскле” выбраны участки склонов на южной экспозиции с одинаковым уклоном 3°–4° на пашне (катена “Пашня”) и в заповеднике (катена “Лес”). По такому же принципу выбраны объекты для изучения черноземов на ключевом участке “Ямская степь” (катена “Пашня” на целине и катена “Степь” на территории заповедника). Литологические условия и гранулометрический состав во всех случаях схожи.

Изучались почвы в трех участках катен: локальный водораздел–транзитная зона–аккумулятивная зона. В каждой геоморфологической по-

зиции делали два разреза на удалении 5–7 м друг от друга.

Пахотные почвы ключевого участка “Лес на Ворскле” на водораздельном участке и транзитной зоне представлены агросерыми абрадированными супесчаными почвами на лёссовидных породах с утраченным горизонтом АУ. В аккумулятивной позиции катены развиты агросерые агропроградированные почвы с горизонтом АУрг. Целинные почвы на всех участках катен представлены серыми грубогумусированными легкосуглинистыми почвами на лёссовидных отложениях.

На ключевом участке “Ямская степь” на всех участках катены целинных почв развиты черноземы сегрегационные мощные тяжелосуглинистые глубоко карбонатные на карбонатных лёссовидных суглинках. В катене пахотных почв – агрочерноземы сегрегационные мощные тяжелосуглинистые глубоко карбонатные на карбонатных лёссовидных суглинках. Отмечена некоторая тенденция к утяжелению гранулометрического состава и увеличению мощности сохранившейся части горизонта АУ в аккумулятивной области катены, где развиты средне- и тяжелосуглинистые почвы.

Проводили морфолого-генетическое описание профилей и отбор образцов почв на химические анализы. Образцы почв для исследования состояния микробных сообществ почв отбирали из верхних слоев 0–10 и 10–20 см репрезентативно и с соблюдением асептических условий в полиэтиленовые пакеты. В лабораторных условиях образцы усредняли, удаляли корни и растительные остатки и просеивали через сито с диаметром ячеек 2 мм. Всего проанализировано 48 образцов (4 катены × 3 участка × 2 разреза × 2 слоя).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Во всех образцах изученных почв проведено определение: рН водной вытяжки потенциометрическим методом; содержания органического углерода по Тюрину; содержания карбонатов ацидиметрическим методом (Аринушкина, 1970); анализа гранулометрического состава – пипеточным методом (Теории и методы..., 2007). Кроме того, определено общее содержание углерода и азота на анализаторе Vario MAX CHNS (Elementar, Deutschland). Вышеупомянутые анализы выполнены в Центре коллективного пользования Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН.

Углерод живой микробной биомассы ( $C_{\text{мб}}$ ) рассчитывали по содержанию фосфолипидов в мембранах почвенных микроорганизмов (Хомутова, Демкин, 2011). Метод предполагает последовательное выполнение операций: экстракции фосфолипидов из почвенного образца в однофазной смеси (метанол : хлороформ : фосфатный буфер 1 : 2 : 0.8),

осаждения почвенного осадка центрифугированием, расслаивания супернатантов на верхний водный слой, содержащий буферный раствор, который удаляют, и нижний органический слой, содержащий липиды, в том числе и фосфолипиды, который в дальнейшем анализируют с использованием спектрофотометра. Измерения выполнялись в трехкратной повторности.

Ферментативную активность определяли микропланшетным методом (Deng et al., 2013; Margenot et al., 2018). К 0.5 г почвы приливали 60 мл воды. Встряхивали 30 мин на магнитной качалке при скорости 600 об./мин. Предварительно раскапали в каждую ячейку планшета по 50 мкл раствора модифицированного универсального буфера с оптимальным рН для каждого фермента (для КФ, БГ, ХТ и ксилозидазы (КС) – 5.8, для ЩФ – 9.0). После этого прилили по 50 мкл субстрата в каждую ячейку планшета. Инкубировали при 30°C в течение 1 ч для ЩФ, 3 ч – для КФ и БГ, 8 ч – для ХТ и КС. В качестве субстратов использовали хромогенно (на основе 4-нитрофенола) или флуорогенно (на основе 4-метилумбеллиферона) меченные субстраты. После инкубации измеряли: оптическую плотность на планшетном ридере xMark (Bio-Rad, USA) при длине волны 410 нм или количество флуоресценции на флуориметре Fluoroskan (Thermo Fisher Scientific, USA) при длине волны возбуждения эмиссии 355 нм и испускания 460 нм. Измерения проводили в четырех повторностях.

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами, использовали метод главных компонент в программе PCORD 5. Дисперсионный анализ проводили в программе PAST 4.03.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Химические свойства и гранулометрический состав почв*

#### **Ключевой участок “Лес на Ворскле”**

Почвы в катенах “Лес” и “Пашня” характеризуются легкосуглинистым гранулометрическим составом, который утяжелялся с глубиной (табл. 1, рис. 2).

В целинной серой почве гранулометрический состав в верхнем горизонте одинаковый на всех участках катены. Содержание физической глины варьирует в пределах 20–24%. В случае с транзитной частью катены большая мощность горизонта АЕЛ обуславливает более легкий гранулометрический состав в слое 20–40 см, но в слоях 0–10 и 10–20 см различия между участками катены незначительны.

Содержание  $C_{\text{орг}}$  в почвах водораздельного участка и аккумулятивной части склона катены “Лес” близкое, здесь в слое 0–10 см оно составляет 2.7%. Более низкое содержание  $C_{\text{орг}}$  в почвах

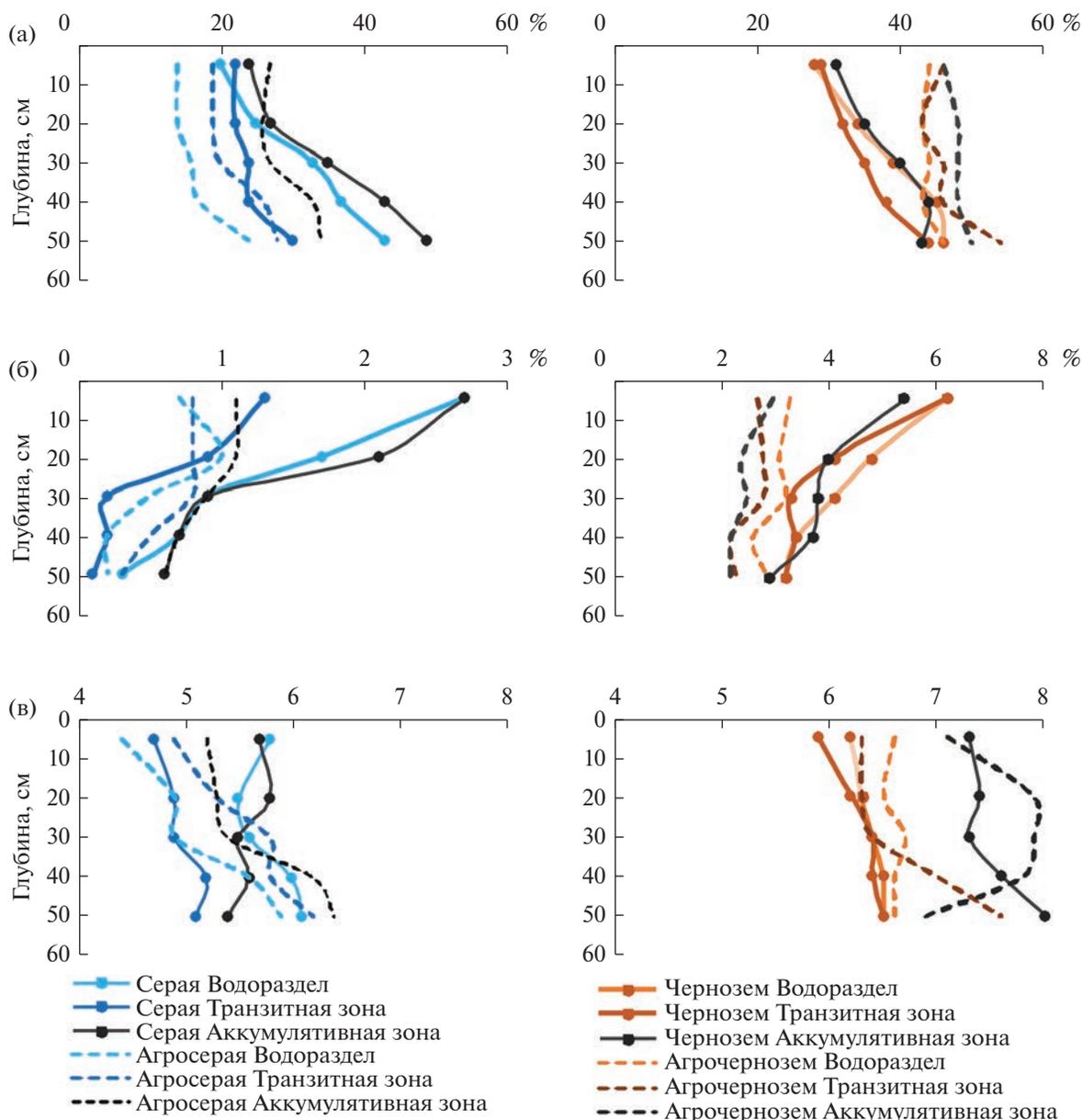


Рис. 2. Содержание физической глины (а), органического углерода (б) и значения рН (в) в исследованных почвах.

транзитной зоны связано с особенностями эрозионно-аккумулятивных процессов в этой части катены. При этом в катене “Пашня” содержание  $S_{орг}$  ниже в 2–4 раза. Кроме того, в пахотных почвах не выявлено существенных различий в содержании  $S_{орг}$  на различных глубинах.

Соотношение C/N на различных участках катены и в различных слоях почв варьирует в пределах от 5.6 до 9.7.

Значения рН заметно варьируют в зависимости от положения почв в катене. Здесь в первую очередь следует отметить транзитный участок в катене целинных серых почв, где этот показатель менее 5. В пахотном горизонте в катене агросерых

почв рН в значительной мере смещен в кислую область, при этом хорошо заметна тенденция возрастания рН от водораздела к аккумулятивной части склона.

#### Ключевой участок “Ямская степь”

Почвы в катенах целинных и антропогенно-преобразованных почв характеризуются среднесуглинистым гранулометрическим составом (табл. 1, рис. 2). В агрочерноземах отмечено возрастание доли тяжелых фракций в пахотном горизонте, что, по-видимому, следует связывать с привносом физической глины в результате склоновых процессов.

Таблица 1. Химические свойства и гранулометрический состав в почвах

Геоморфологическое положение	Глубина, см	рН	C <sub>орг</sub>	N <sub>общ</sub>	C/N	CaCO <sub>3</sub>	Содержание частиц		
							<0.01 мм	<0.001 мм	
							%		
Ключевой участок “Лес на Ворскле” (серые почвы)									
Лес	Водораздел	0–10	5.8	2.7	0.3	10.0	0.74	20	3
		10–20	5.5	1.7	0.1	6.2	0.67	25	5
	Транзитная зона	0–10	4.7	1.3	0.2	9.7	0.52	22	3
		10–20	4.9	0.9	0.1	6.7	0.45	22	3
	Аккумулятивная зона	0–10	5.7	2.7	0.3	9.9	0.89	24	6
		10–20	5.8	2.1	0.2	6.3	0.82	27	8
Пашня	Водораздел	0–10	4.4	0.7	0.2	8.5	0.45	14	4
		10–20	4.9	0.9	0.1	6.5	0.30	14	4
	Транзитная зона	0–10	4.9	0.8	0.1	6.5	0.59	19	8
		10–20	5.3	0.8	0.1	9.3	0.22	19	7
	Аккумулятивная зона	0–10	5.2	1.1	0.2	9.2	0.82	27	9
		10–20	5.3	1.1	0.1	9.5	0.30	26	9
Ключевой участок “Ямская степь” (черноземы)									
Степь	Водораздел	0–10	6.2	6.2	0.6	12.4	1.11	28	9
		10–20	6.3	4.8	0.5	11.1	1.19	34	11
	Транзитная зона	0–10	5.9	6.2	0.6	11.8	1.04	29	8
		10–20	6.2	4.1	0.3	10.9	1.04	32	11
	Аккумулятивная зона	0–10	7.3	5.4	0.5	10.8	1.49	31	10
		10–20	7.4	4.0	0.4	11.3	1.41	35	13
Пашня	Водораздел	0–10	6.6	3.3	0.3	12.2	1.19	44	21
		10–20	6.5	3.1	0.3	11.9	1.04	43	21
	Транзитная зона	0–10	6.3	2.7	0.2	16.3	1.11	46	24
		10–20	6.3	2.8	0.2	16.4	1.04	43	23
	Аккумулятивная зона	0–10	6.9	3.0	0.2	15.8	1.19	46	23
		10–20	7.1	2.4	0.2	14.3	1.19	48	24

Содержание C<sub>орг</sub> в целинных черноземах достигает 6.2% в слое 0–10 см и уменьшается с глубиной. В катене агрочерноземов содержание C<sub>орг</sub> в верхнем пахотном слое ниже в 1.5–2.0 раза. Аналогично пахотным почвам ключевого участка “Лес на Ворскле”, содержание C<sub>орг</sub> на глубинах 0–10 и 10–20 см различается несущественно.

Соотношение C/N в изученных почвах варьирует в пределах от 10.5 до 15.8. Большие значения данного показателя в черноземах, по сравнению с серыми почвами, указывают на более низкую степень разложения почвенного органического вещества на участке “Ямская степь”. Микробное разложение приводит к снижению количества углерода по отношению к азоту: минерализован-

ный азот сохраняется в микробной биомассе, а углерод окисляется до CO<sub>2</sub> (Пастухов и др., 2018).

Значения рН данного ключевого участка изменяются от нейтральных до слабощелочных с тенденцией возрастания значений рН в почвах аккумулятивной зоны как естественных, так и пахотных почв.

#### Микробная биомасса

Распашка приводит к уменьшению микробной биомассы (рис. 3), что согласуется с литературными данными (Лысак и др., 2004; Масютенко и др., 2009; Bittman et al., 2005; Jiang et al., 2011). Наблюдается характерное возрастание микробной биомассы в агросерой почве в аккумулятивной

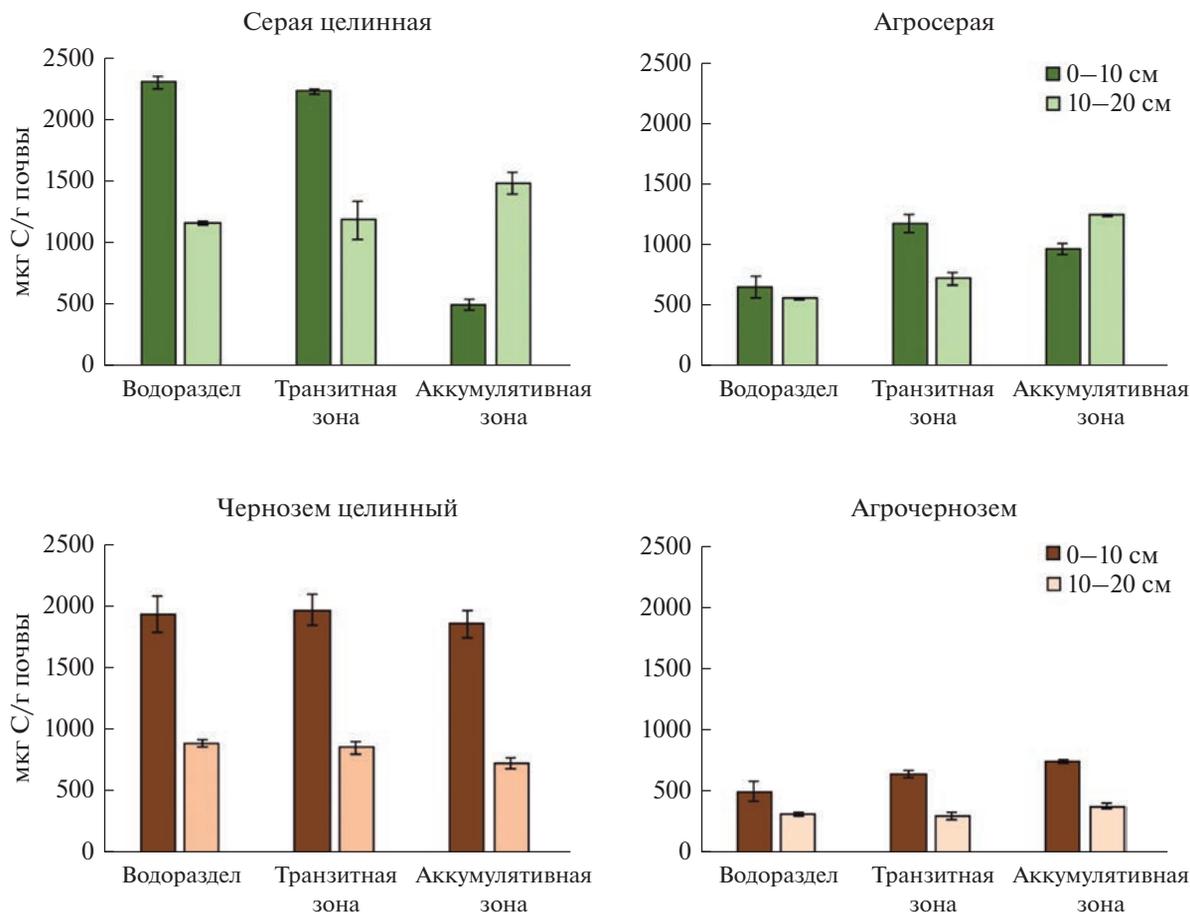


Рис. 3. Микробная биомасса в целинных и пахотных почвах.

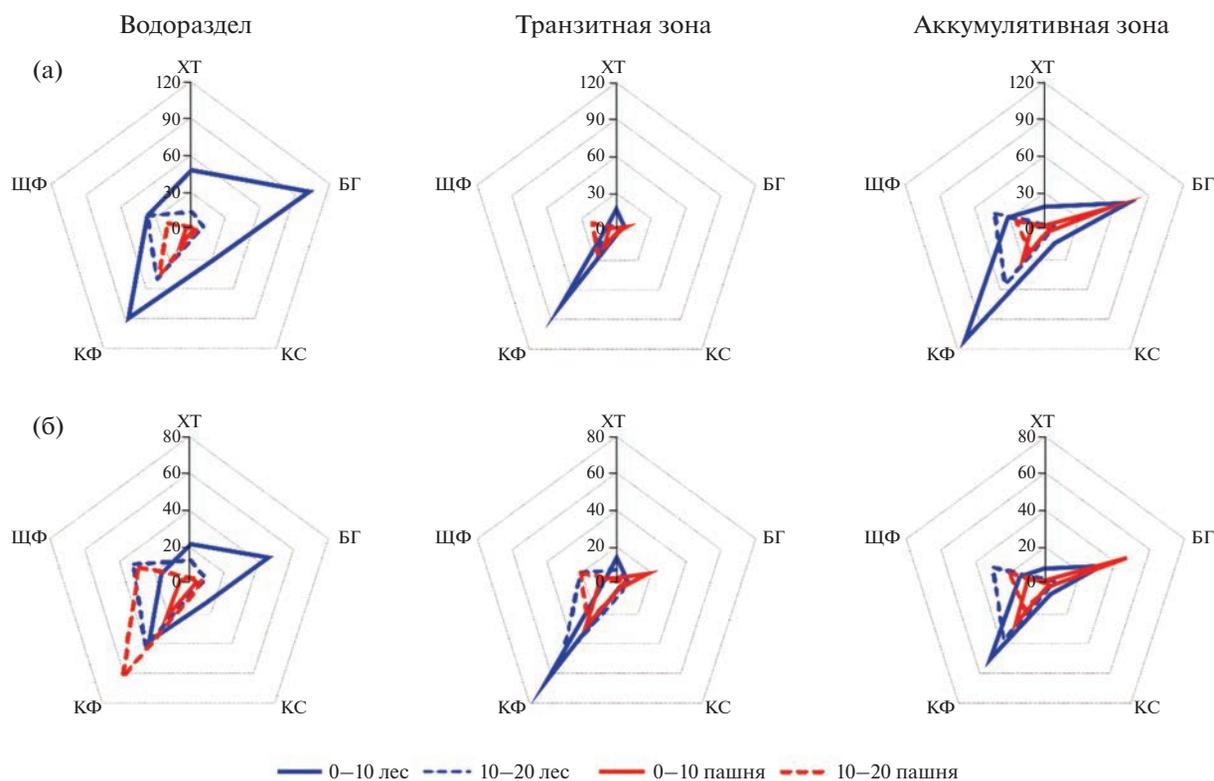
ной зоне катены, чего не отмечается в катене агрочерноземов. В черноземах ключевого участка “Ямская степь” уменьшение микробной биомассы в результате сельскохозяйственного использования более существенно, по сравнению с серыми почвами ключевого участка “Лес на Ворскле”. Неожиданными оказались различия в значениях микробной биомассы между верхней и нижней частью пахотного горизонта. Так, в агросерой почве в слое 10–20 см пахотного горизонта на всех участках катены микробная биомасса выше, чем в верхнем слое. Возможно, это связано с дифференциацией исходно гомогенного почвенного материала со временем, прошедшим между обработкой почвы и отбором почвенных образцов.

#### Ферментативная активность

Значения активности изученных ферментов, выраженных на массу почвы, в целом выше в целинных почвах (рис. 4а, 5а). Отмечено лишь достоверное ( $p < 0.001$ ) увеличение активности БГ в агрочерноземе ключевого участка “Ямская степь”. Увеличение активности этого фермента указывает на

увеличение скорости разложения почвенного органического вещества в степных пахотных почвах (Stott et al., 2010). Распашка черноземов приводит к достоверному ( $p < 0.001$ ) уменьшению активности КФ и ЩФ. В серых почвах ключевого участка “Лес на Ворскле” вследствие распашки произошло достоверное ( $p < 0.04$ ) уменьшение активности ХТ, КС и КФ. Активность БГ, КФ и ЩФ выше в целинных степных почвах, а в лесных целинных почвах выше активность ХТ. Высокая хитиназная активность обусловлена большой биомассой грибного сообщества в почвах лесных экосистем. Активность этого фермента рассматривают в качестве индикатора грибной биомассы, так как хитин является основным компонентом клеточных стенок грибов (Marinari, Antisari, 2010).

В целинных черноземах ключевого участка “Ямская степь” можно отметить несколько большие значения ферментативной активности в почвах на водораздельном и аккумулятивном участках склона. Максимальные различия проявляются в отношении ЩФ: так, в слое 0–10 см на водораздельном участке ее значения достигают 185 нмоль 4-НФ/г почвы в час, а в аналогичном слое в почве



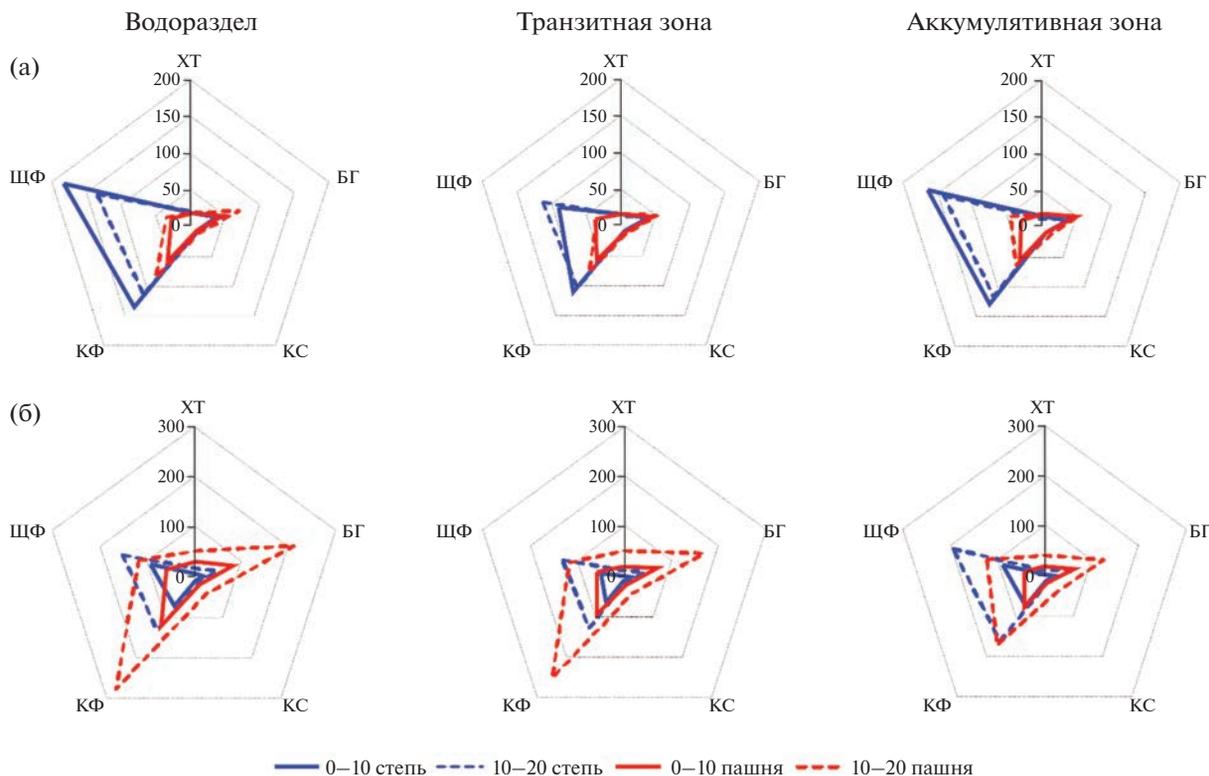
**Рис. 4.** Ферментативная активность целинных и агросерых почв ключевого участка “Лес на Ворскле” в различных положениях катены (ХТ – хитиназа, БГ –  $\beta$ -глюкозидаза, КС – ксилозидаза, КФ – кислая фосфатаза, ЩФ – щелочная фосфатаза, здесь и на рис. 5 и 6); (а) абсолютная активность (нмоль 4-МУФ/г почвы в час), (б) удельная активность (мкмоль 4-МУФ/г  $C_{мб}$  в час).

транзитной зоны – 90 нмоль 4-НФ/г почвы в час, что связано, вероятно, с особенностями эрозионно-аккумулятивных процессов в этой части склона. Распашка во многом нивелирует различия в биологической активности почв на разных участках склона: в пахотных агрочерноземах не выявлено достоверных различий в ферментативной активности в зависимости от положения в катене.

Для серых почв зависимость ферментативной активности от положения в катене более заметна. В целинных серых почвах отмечена большая активность ХТ, БГ и КС на водораздельном участке, активность КФ максимальна в почве аккумулятивной зоны. В целом же, как и в катенах черноземов, минимальные значения ферментативной активности выявлены в целинной серой почве в транзитной зоне. В агросерых почвах наблюдается увеличение активности КФ на водораздельном участке склона, что связано с уменьшением содержания доступных фосфатов на данном отрезке. Высокие значения активности БГ в почвах в аккумулятивной части катены связаны с большим содержанием  $C_{орг}$  и большим содержанием физической глины в аккумулятивной области катены агросерых почв, что в свою очередь является следствием намыва мелкозема.

Таким образом, отличия в ферментативной активности почв на различных участках катен в большей степени характерны для пахотных почв и менее заметны в катенах их целинных аналогов. В целом, большая вариабельность в зависимости от геоморфологических условий характерна для почвенных ферментов фосфатного цикла. Отсутствие изменчивости в активности ферментов углеродного цикла в черноземах естественных и пахотных катен может быть связано с меньшей скоростью разложения почвенного органического вещества и его большей стабильностью, по сравнению с серыми лесными почвами. Аналогичные геоморфологически обусловленные закономерности в функциональном разнообразии и структуре микробных сообществ почв выявлены при изучении дыхательных откликов на внесение низкомолекулярных источников углерода (Душанова и др., 2023).

Как и в случае с микробной биомассой, неожиданными являются различия в значениях ферментативной активности между верхней и нижней частью пахотного горизонта агросерой почвы. Причем высокая ферментативная активность в слое 10–20 см наблюдается и в пахотных почвах, и в целинных, хотя в последнем случае различия менее выражены. Причины высокой ферментативной



**Рис. 5.** Ферментативная активность (нмоль 4-НФ/г почвы в час) целинных почв и агрочерноземов ключевого участка “Ямская степь” в различных положениях катены; (а) абсолютная активность (нмоль 4-НФ/г почвы в час), (б) удельная активность (мкмоль 4-НФ/г  $C_{mb}$  в час).

активности почв в слое 10–20 см – достаточно стабильные температурные и водно-воздушные условия в более глубоких слоях при одинаковом с верхним слоем содержании  $C_{орг}$  и илистой фракции.

*Удельная ферментативная активность*

Ферментативная активность, выраженная на массу почвы, не позволяет в полной мере оценить состояние микробного сообщества как такового, поскольку одна и та же единица микробной биомассы в разных условиях может демонстрировать разную степень активности. В этом аспекте ферментативная активность является в большой степени экологической характеристикой почвы как части экосистемы, что не позволяет судить о состоянии самого микробного сообщества и не дает возможности сравнивать между собой состояние микробных сообществ двух почв. В связи с этим проведен расчет ферментативной активности на единицу микробной биомассы – удельной активности. Различия в удельной активности ферментов целинных и пахотных вариантов, как мы полагаем, характеризуют внутреннюю структуру и состояние микробных сообществ и в большей степени отража-

ют изменения последних в связи с геоморфологическими условиями и антропогенным воздействием.

Удельная ферментативная активность агросерых почв и агрочерноземов различается весьма существенно, при этом активность отдельных ферментов при земледельческом освоении меняется разнонаправленно (рис. 46, 56). Распашка черноземов приводит к достоверному увеличению удельной активности ХТ, БГ и КС ( $p < 0.01$ ). При этом распашка практически не отражается на активности КФ и ЩФ. Если активности всех изученных ферментов на единицу массы почвы не различаются в разных позициях в катене агрочерноземов, то удельная активность БГ, КФ и ЩФ несколько повышена в агрочерноземе на водоразделе, а активность ЩФ также увеличена в почве аккумулятивной зоны. Следует отметить, что во всех почвах ферментативная активность выше в слое 10–20 см.

В катенах серых почв ключевого участка “Лес на Ворскле” противоположная ситуация: здесь распашка обуславливает снижение ферментативной активности, приведенной к микробной биомассе, но достоверное уменьшение выявлено только в отношении активности ХТ и КФ ( $p < 0.05$ ). Важно отметить увеличение удельной активности

КФ в слое 10–20 см в агросерой почве транзитной зоны, а также удельной активности БГ в транзитной и аккумулятивной зонах катены, хотя различия недостоверны между целинными и пахотными почвами. Распределение ферментативной активности, выраженной на микробную биомассу, по профилю почвы в целом аналогично распределению ферментативной активности, выраженной на массу почвы. Лишь ЩФ на всех участках катен выше в слое 10–20 см. Особо следует отметить более высокие значения активности всех ферментов в почве на водораздельном участке пашни.

Ранее показано (Silva et al., 2019), что активность ферментов, выраженная на единицу микробной биомассы, отражает метаболический статус микробного сообщества и изменения в пуле стабилизированных ферментов. Следовательно, полученные нами результаты свидетельствуют о возрастании физиологической эффективности микробного сообщества при распашке степных почв. В случае с лесными почвами удельная ферментативная активность уменьшена, можно лишь отметить тенденцию к увеличению удельной активности БГ при распашке.

Известно, что ферментативная активность увеличивается при избытке ресурса и уменьшается при его недостатке, что является стратегией выживания почвенных микроорганизмов в соответствии с теорией микробного метаболизма (Sinsabaugh et al., 2008). Удельная активность, напротив, не связана с изменением степени доступности ресурса, и ее высокие значения в почвах обусловлены большей скоростью продуцирования ферментов при распашке почвы (De Medeiros et al., 2015).

#### *Статистическая обработка данных*

Статистическая обработка результатов оценки ферментативной активности почв и связанных с ней физико-химических показателей, проводилась с помощью метода главных компонент (рис. ба).

Показано, что с первыми двумя факторами связаны 78% общей вариации. Все почвенные характеристики, кроме содержания  $\text{CaCO}_3$ , значимы ( $p = 0.05$ ). С фактором 1 преимущественно связана ферментативная активность, pH, содержание  $\text{C}_{\text{орг}}$ , соотношение C/N. При этом наиболее тесную отрицательную взаимосвязь с фактором 1 демонстрируют содержание  $\text{C}_{\text{орг}}$ , активность БГ, ХТ, КС и ЩФ. Для показателей гранулометрического состава обнаружена слабая отрицательная взаимосвязь с фактором 1 и слабая положительная взаимосвязь с фактором 2. Микробная биомасса показывает тесную отрицательную взаимосвязь с фактором 2.

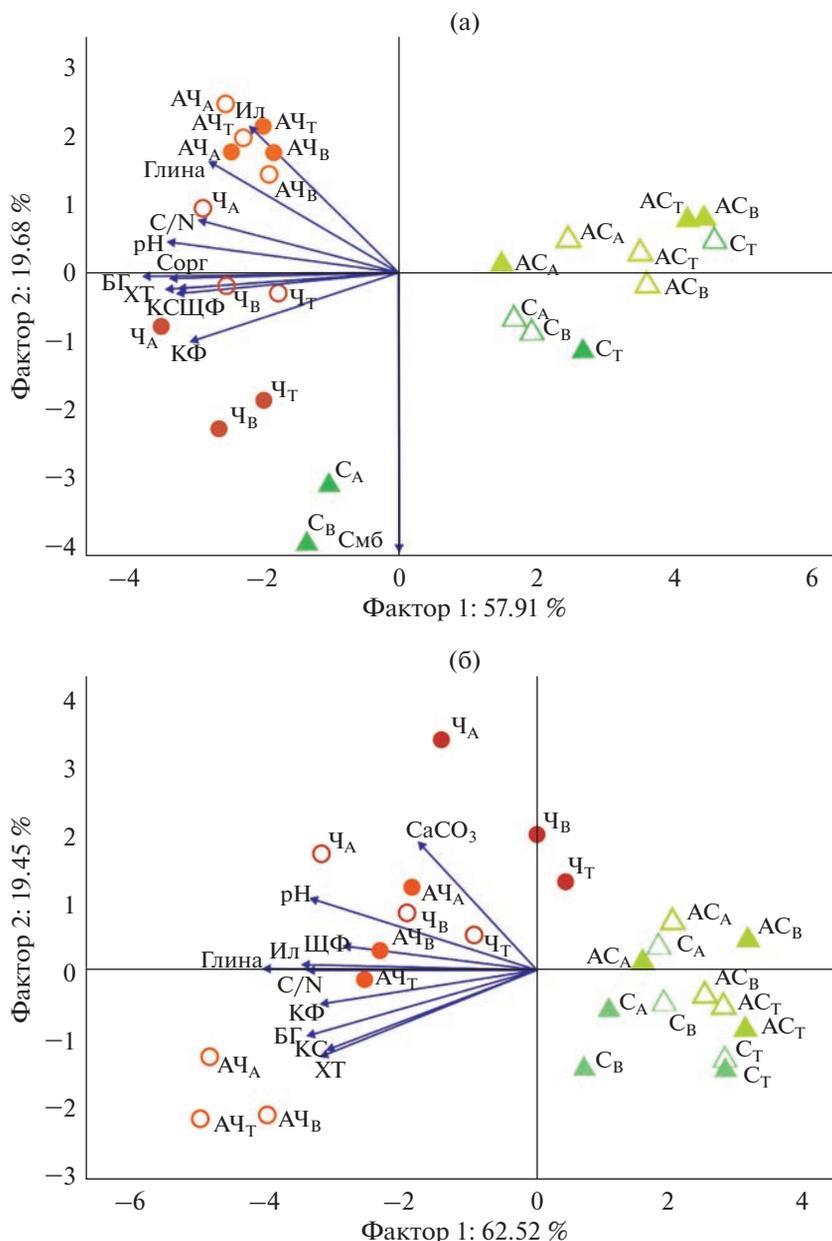
Фактор 1, объясняющий 57.9% вариации, преимущественно связан с типом почвы. В правой полуплоскости расположены главным образом серые

лесные почвы, а в левой — черноземы. Фактор 2, объясняющий 19.7% вариации, связан с антропогенной трансформацией почв: пахотные варианты почв, как правило, сгруппированы в верхней полуплоскости, а заповедные варианты — в нижней.

Группировка объектов по типу почвы обусловлена разными типами растительных остатков, поступающих в почву в условиях лесной и степной экосистем, и условиями для их минерализации почвенными микроорганизмами. В первую очередь это относится к корневой массе, объемы которой в степных почвах значительно выше, по сравнению с лесными почвами (Базилевич, 1993). Именно большие объемы корневой мортмассы, поступающей в степные почвы, обуславливают более высокую биологическую активность черноземов, по сравнению с серыми лесными почвами.

Распределение почв по фактору 2, связанное с антропогенной нагрузкой, обусловлено существенными различиями микробной биомассы в заповедных и пахотных почвах. Наибольшее отрицательное смещение по фактору 2 отмечено для верхнего слоя целинных серых лесных почв на водоразделе и в аккумулятивной части катены. Именно здесь зафиксированы максимальные значения микробной биомассы. В верхнем слое транзитной части целинной катены серых лесных почв значения данного показателя в 2.0–2.5 раза меньше. На факторной плоскости соответствующая точка входит в группу целинных серых лесных почв, располагаясь рядом с координатами, отмеченными для слоя 10–20 см на водоразделе и в аккумулятивной части катены. В слое 10–20 см транзитной части заповедной катены биологическая активность уменьшена до уровня агросерых почв. При этом микробная биомасса последних достоверно не отличается в слоях 0–10 и 10–20 см, что отражает тесную группировку соответствующих точек. Такая же закономерность отмечена и для агрочерноземов, где различия микробной биомассы в отдельных слоях несущественны. В заповедных черноземах слои 0–10 и 10–20 см по количеству микробной биомассы отличаются в 2.0–2.5 раза, на что указывает их послынное разделение на факторной плоскости.

Ферментативная активность, выраженная на микробную биомассу (рис. бб), обнаруживает иные взаимосвязи с почвенными характеристиками, прежде всего с гранулометрическим составом почв, что позволяет несколько иначе рассмотреть зональные и антропогенно обусловленные различия их биологической активности. Первые два фактора объясняют 82% общей вариации. Все почвенные характеристики, кроме содержания  $\text{C}_{\text{орг}}$ , значимы ( $p = 0.05$ ). Показатели ферментативной активности, pH, гранулометрического состава, C/N, связаны с фактором 1. При этом наиболее тесную отрицательную взаимосвязь проявляют: содержание ила, глины, C/N, активность ЩФ и



**Рис. 6.** Метод главных компонент для химических и микробиологических параметров. (а) Абсолютная ферментативная активность, (б) удельная ферментативная активность. Условные обозначения: С – серые целинные почвы, АС – агросерые, Ч – черноземы целинные, АЧ – агрочерноземы. Малые индексы: В – водораздельный участок, Т – транзитная зона, А – аккумулятивная зона. Закрашенные символы – слой 0–10 см, не покрашенные символы – слой 10–20 см.

КФ. Активности БГ, КС и ХТ находятся в слабой отрицательной взаимосвязи с факторами 1 и 2. Содержание CaCO<sub>3</sub> и pH обнаруживают слабую положительную взаимосвязь с фактором 1.

Фактор 1, объясняющий 62.5% вариации, связан с типом почвы. В правой полуплоскости главным образом расположены серые лесные почвы, а в левой – черноземы. Вдоль фактора 2, объясняющего 19.5% вариации, отмечено разделение заповедных черноземов, группирующихся в верхней полуплоскости и агрочерноземов – в нижней

полуплоскости. В целом, удельная ферментативная активность черноземов убывает в ряду: агрочерноземы, слой 10–20 см → агрочерноземы, слой 0–10 см → заповедные черноземы, слой 10–20 см → заповедные черноземы, слой 0–10 см. Уменьшение микробной биомассы как с глубиной, так и в результате распашки не сопровождается эквивалентным уменьшением ферментативной активности почвы, а удельная ферментативная активность при этом значительно возрастает, что, как было сказано выше, связано с большей

метаболической активностью пахотных почв, по сравнению с целинными.

В группе серых почв целинные варианты, как правило, располагаются на факторной плоскости ниже и левее, чем пахотные. Это расположение обусловлено, прежде всего, высокой активностью КФ. Заметное увеличение удельной активности ХТ, КС и БГ – ферментов азотного и углеродного циклов – отмечены в данной группе только на водоразделе в слое 0–10 см.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тип почвы и связанная с ним разница объемов и форм органического вещества, структур микробного сообщества и их метаболического разнообразия обуславливают выявленные различия ферментативной активности целинных серых почв и черноземов. Все эти факторы, в свою очередь, зависят от характера растительности (древесная/травянистая), а также от ежегодных объемов отмершей фитомассы и преимущественной локализации процессов микробного разложения последней (наземный слой/почва). Немаловажную роль играют физико-химические условия и гранулометрический состав почв, а также склоновые процессы, приводящие к перераспределению мелкозема. В связи с этим абсолютно ожидаемой выглядит более высокая ферментативная активность целинных черноземов, по сравнению с серыми лесными почвами. Спектр ферментов, характеризующихся высокой активностью, также определяется типом растительного материала: в этом отношении показательна высокая активность хитиназы в лесных почвах, где грибы выступают в качестве ведущего деструктора древесной мортмассы. Однако следует отметить, что в лесных экосистемах в силу более активных эрозионно-аккумулятивных процессов заметную роль в общей ситуации с ферментативной активностью играет положение почвы в катене. Особенно это касается серой лесной почвы в транзитной области катены.

Можно также отметить, что в целинных вариантах катены серых почв слои 0–10 и 10–20 см почв различаются по ферментативной активности, а, следовательно, и по метаболическому разнообразию микробных сообществ, в то время как в целинных черноземах таких различий между слоями не наблюдается.

Весьма показательны изменения ферментативной активности почв при распашке. На фоне уменьшения микробной биомассы происходит значительное уменьшение ферментативной активности почв обоих типов, однако активность оставшейся части микробного сообщества существенным образом отличается в агрочерноземах и агросерых почвах. Распашка чернозема провоцирует резкое увеличение удельной ферментатив-

ной активности (приведенной к единице микробной биомассы). При этом в катенах серых и агросерых почв значения ферментативной активности, приведенные к единице массы почвы и к единице микробной биомассы, были довольно близки. Это свидетельствует о более высоких уровнях и физиологической эффективности микробного сообщества пахотного чернозема, и скорости продуцирования ферментов на единицу микробной биомассы. Иными словами, если в серых лесных почвах при распашке наблюдается абсолютное угнетение биологической активности, то в черноземах этого не происходит. Да, рассчитанные на единицу массы почвы микробная биомасса и активность ферментов уменьшаются, однако активность оставшейся части микробного сообщества возрастает. И в первую очередь это относится к нижней части пахотного горизонта, где условия функционирования почвенных микроорганизмов более стабильны.

Такого рода агрессивность микробного сообщества пахотных черноземов представляется нам весьма тревожным сигналом того, что скорость минерализации органического вещества в условиях распашки будет резко увеличиваться, что может привести к быстрому истощению почвы, как это, по-видимому, уже произошло с рассмотренными агросерыми почвами.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 22-68-00010.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что нет конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аринушкина Е.В.* Руководство по химическому анализу почв. М.: МГУ, 1970. 487 с.
- Базилевич Н.И.* Биологическая продуктивность экосистем Северной Евразии. М.: Наука, 1993. 295 с.
- Дущанова К.С., Украинский П.А., Каширская Н.Н. и др.* Биомасса и функциональное разнообразие микробных сообществ в катенах целинных и пахотных серых почв и черноземов // Почвоведение. 2023. (в печати)
- Игнатенко О.С., Собакинский В.Д.* Некоторые итоги охраны растительности Стрелецкой степи // Эколого-целотические и географические особенности растительности (к 100-летию В.В. Алехина) / Ред. А.Г. Воронцов, Г.И. Дохман. М.: Наука, 1983. С. 99–106.

- Касаткина Г.А., Федорова Н.Н., Русаков А.В.* Почвы и почвенный покров заповедника “Белогорье” // Вестн. СПбГУ. 2012. № 1. Сер. 3. Биол. С. 121–138.
- Лысак Л.В., Семенова Н.А., Буланкина М.А. и др.* Бактерии в окультуренных почвах монастырей таежно-лесной зоны // Почвоведение. 2004. № 8. С. 976–985.
- Масютенко Н.П., Нагорная О.В., Лукьянчикова О.В.* Влияние удобрений, типа севооборота, экспозиции склона и вида угодий на динамику содержания микробной биомассы в черноземе типичном // Агрохимия. 2009. № 5. С. 49–54.
- Мостовая А.С., Курганова И.Н., Лопес де Гереню В.О. и др.* Изменение микробиологической активности серых лесных почв в процессе естественного лесовосстановления // Вестн. Воронеж. ГУ. Сер. Хим. Биол. Фарм. 2015. № 2. С. 64–72.
- Пастухов А.В., Кноблаух К., Яковлева Е.В., Каверин Д.А.* Маркеры трансформации органического вещества в мерзлотных бугристых болотах на Европейском Северо-Востоке // Почвоведение. 2018. № 1. С. 48–61.
- Русаков А.В.* Почвы и почвенный покров Ямской степи. СПб.: СПбГУ, 2012. 216 с.
- Собина А.С., Хачиков Э.А., Шмараева А.Н. и др.* Биологическая активность чернозема обыкновенного через 5 лет после прекращения агрогенной обработки // Агрохим. вестн. 2022. № 1. С. 22–26.
- Счастливая Л.С., Касаткина Г.А.* Почвенно-географические исследования в заповеднике “Лес на Ворскле” – “Белогорье” // Вестн. СПбГУ. Сер. 3. Биол. 2006. № 1. С. 81–87.
- Теории и методы физики почв / Ред. Е.В. Шеин, Л.О. Карпачевский. М.: Гриф и К, 2007. 616 с.
- Украинский П.А., Щербаков К.В.* Эрозионный рельеф участка Ямская степь (природный заповедник “Белогорье”) // Науки о земле. 2014. № 1–2. С. 84–91.
- Хазиев Ф.Х.* Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. М.: Наука, 1982. 204 с.
- Хомутова Т.Э., Демкин В.А.* Оценка биомассы микробных сообществ почв сухих степей по содержанию в них фосфолипидов // Почвоведение. 2011. № 6. С. 748–754.
- Beheshti A., Raiesi F., Golchin A.* Soil properties, C fractions and their dynamics in land use conversion from native forests to croplands in northern Iran // Agric. Ecosyst. Environ. 2012. V. 148. P. 121–133.
- Bergstrom D.W., Monreal C.M., Millette J.A., King D.J.* Spatial dependence of soil enzyme activities along a slope // Soil Sci. Soc. Am. J. 1998. V. 62. P. 1302–1308.
- Bittman S., Forge T.A., Kowalenko C.G.* Responses of the bacterial and fungal biomass in a grassland soil to multi-year applications of dairy manure slurry and fertilizer // Soil Biol. Biochem. 2005. V. 37. P. 613–623.
- Burns R.G., DeForest J.L., Marxsen J. et al.* Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions // Soil Biol. Biochem. 2013. V. 58. P. 216–234.
- Cui Y., Bing H., Fang L. et al.* Extracellular enzyme stoichiometry reveals the carbon and phosphorus limitations of microbial metabolisms in the rhizosphere and bulk soils in alpine ecosystems // Plant Soil. 2019. V. 458. P. 7–20.
- De Medeiros E.V., De Alcantara Notaro K., De Barros J.A. et al.* Absolute and specific enzymatic activities of sandy entisol from tropical dry forest, monoculture and intercropping areas // Soil Till. Res. 2015. V. 145. P. 208–215.
- Deng S., Popova I.E., Dick L., Dick R.* Bench scale and microplate format assay of soil enzyme activities using spectroscopic and fluorometric approaches // Appl. Soil Ecol. 2013. V. 64. P. 84–90.
- Dengiz O., Kizilkaya R., Göl C., Hepşen Ş.* Effects of different topographic positions on soil properties and soil enzymes activities // As. J. Chem. 2007. V. 19. P. 2295–2306.
- Guan H.L., Fan J.W., Lu X.* Soil specific enzyme stoichiometry reflects nitrogen limitation of microorganisms under different types of vegetation restoration in the karst areas // Appl. Soil Ecol. 2022. V. 169. P. 104253.
- Jiang X., Wright A.L., Wang X., Liang F.* Tillage-induced changes in fungal and bacterial biomass associated with soil aggregates: a long-term field study in a subtropical rice soil in China // Appl. Soil Ecol. 2011. V. 48. P. 168–173.
- Kivlin S.N., Treseder K.K.* Soil extracellular enzyme activities correspond with abiotic factors more than fungal community composition // Biogeochemistry. 2014. V. 117. P. 23–37.
- Lagomarsino A., Benedetti A., Marinari S. et al.* Soil organic C variability and microbial functions in a Mediterranean agro-forest ecosystem // Biol. Fertil. Soils. 2011. V. 47. P. 283–291.
- Margenot A.J., Nakayama Y., Parikh S.J.* Methodological recommendations for optimizing assays of enzyme activities in soil samples // Soil Biol. Biochem. 2018. V. 125. P. 350–360.
- Marinari S., Antisari L.V.* Effect of lithological substrate on microbial biomass and enzyme activity in brown soil profiles in the northern Apennines (Italy) // Pedobiologia. 2010. V. 53. P. 313–320.
- Nannipieri P., Giagnoni L., Landi L., Renella G.* Role of phosphatase enzymes in soil // Phosphorus in action / Eds E. Bünemann, A. Oberson, E. Frossard. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. P. 215–243.
- Raiesi F., Beheshti A.* Soil specific enzyme activity shows more clearly soil responses to paddy rice cultivation than absolute enzyme activity in primary forests of northwest Iran // Appl. Soil Ecol. 2014. V. 75. P. 63–70.
- Rosinger C., Rousk J., Sandén H.* Can enzymatic stoichiometry be used to determine growth-limiting nutrients for microorganisms? – A critical assessment in two subtropical soils // Soil Biol. Biochem. 2019. V. 128. P. 115–126.
- Silva E.D., De Medeiros E.V., Duda G.P. et al.* Seasonal effect of land use type on soil absolute and specific enzyme activities in a Brazilian semi-arid region // Cate-na. 2019. V. 172. P. 397–407.
- Sinsabaugh R.L., Moorhead D.L.* Resource allocation to extracellular enzyme production: a model for nitrogen and phosphorus control of litter decomposition // Soil Biol. Biochem. 1994. V. 26 (10). P. 1305–1311.
- Sinsabaugh R.L., Lauber C.L., Weintraub M.N. et al.* Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale // Ecol. Lett. 2008. V. 11. P. 1252–1264.
- Stott D.E., Andrews S.S., Liebig M.A. et al.* Evaluation of  $\beta$ -glucosidase activity as a soil quality indicator for the soil management assessment framework // Soil Sci. Soc. Am. J. 2010. V. 74 (1). P. 107–119.
- Tischer A., Blagodatskaya E., Hamer U.* Microbial community structure and resource availability drive the catalytic effi-

- ciency of soil enzymes under land-use change conditions // *Soil Biol. Biochem.* 2015. V. 89. P. 226–237.
- Wang M., Ji L., Shen F. et al. Differential responses of soil extracellular enzyme activity and stoichiometric ratios under different slope aspects and slope positions in *Larix olgensis* plantations // *Forests.* 2022. V. 13. P. 845.
- Wang Q., Wang S. Response of labile soil organic matter to changes in forest vegetation in subtropical regions // *Appl. Soil Ecol.* 2011. V. 47. P. 210–216.
- Wickings K., Grandy A.S., Kravchenko A.N. Going with the flow: landscape position drives differences in microbial biomass and activity in conventional, low input, and organic agricultural systems in the Midwestern US // *Agric. Ecosyst. Environ.* 2016. V. 218. P. 1–10.

## **Soil Enzyme Activity in Natural and Ploughed Catenas as Parameters of Physiological State of Microbial Communities**

**E. V. Chernysheva<sup>a</sup>\*, K. S. Dushchanova<sup>a</sup>, T. E. Khomutova<sup>a</sup>, and A. V. Borisov<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences,  
Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Pushchino, Moscow region, Russia*

*\*e-mail: e.chernysheva@yandex.ru*

The study of soil microbial biomass and enzymatic activity of natural and anthropogenically transformed ecosystems was carried out. The catenas of virgin luvisols and chernozems of the Belogorye Natural Reserve and the catenas of arable soils were studied under similar geomorphological and lithological conditions. The activities of enzymes involved in the cycles of carbon ( $\beta$ -glucosidase and xylosidase), nitrogen (chitinase), and phosphorus (acid and alkaline phosphatase) was studied. It has been established that a decrease in soil microbial biomass as a result of ploughing is not accompanied by an equivalent decrease in the enzymatic activity of the soil. Differences in the enzymatic activity of different soils types were revealed, which indicates differences in the structure of the microbial community and the type of phytocenoses. Patterns of changes in the enzymatic activity of soils in watershed areas, in the transit and accumulative parts of catenas have been established. The values of specific enzymes activities (enzymatic activities per unit of microbial biomass) were calculated. The obtained patterns of changes in the specific enzymatic activity of arable soils indicate that, despite the loss of organic matter and a decrease in microbial biomass as a result of plowing, the physiological efficiency of the microbial community of agrochernozem is higher than in virgin soil. High specific enzymatic activity in arable soils is associated with higher rate of enzyme production by soil microorganisms due to land use changes.

*Keywords:* organic matter, microbial communities, phosphatases,  $\beta$ -glucosidase, chitinase, xylosidase, farming practice