

Н. А. Галибина, Е. Н. Теребова, Л. Л. Новицкая, И. Н. Софронова. ДИНАМИКА НЕСТРУКТУРНЫХ УГЛЕВОДОВ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ ДВУХЛЕТНИХ СЕЯНЦЕВ <i>BETULA PENDULA</i> И <i>BETULA PUBESCENCE</i> В ПЕРИОД ВЕГЕТАЦИИ	108
И. М. Дзюбук, Л. П. Рыжков. РОСТ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ МАЛЬКОВ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ В САДКОВОМ ХОЗЯЙСТВЕ КАРЕЛИИ	117
М. А. Вишнякова, В. А. Кошкин, Г. П. Егорова, Л. Ю. Новикова, И. И. Матвиенко. ФОТОПЕРИОДИЧЕСКАЯ И ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ФАСОЛИ (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L.) В УСЛОВИЯХ СЕВЕРО-ЗАПАДА РФ	123
Н. С. Репкина, В. В. Таланова, А. Ф. Титов, И. В. Букарева. РЕАКЦИЯ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ (<i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.) НА РАЗДЕЛЬНОЕ И СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И КАДМИЯ	133
Е. М. Зубова, Н. А. Кашулин. СОВРЕМЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ И РОСТА ЧЕШУИ МАЛОТЫЧИНКОВОГО СИГА <i>COREGONUS LAVARETUS LAVARETUS</i> (<i>COREGONIDAE</i>) ОЗЕРА ИМАНДРА В УСЛОВИЯХ ИНТЕНСИВНОГО ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ	140
И. В. Суховская, Е. В. Борвинская, И. Н. Бахмет, Н. Н. Немова, Л. П. Смирнов. УРОВЕНЬ ГЛУТАТИОНА И АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ В ТКАНЯХ МИДИИ <i>MYTILUS EDULIS</i> L. ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ СРЕДЫ	150
М. А. Назарова, О. Б. Васильева, П. О. Рипатти, Н. Н. Немова. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ В МЫШЦАХ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ <i>PARASALMO MYKISS</i> (WALBAUM, 1972) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПЕРИОДА ХРАНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПЕРЕД ЕГО ФИКСАЦИЕЙ	157
В. В. Лаврова, Е. Н. Икконен, Е. М. Матвеева, М. И. Сысоева. РЕАКЦИЯ УСТЫЧНОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ НА ДЕЙСТВИЕ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ЕЖЕСУТОЧНЫХ СНИЖЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ЗАРАЖЕНИЕ ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКОЙ НЕМАТОДОЙ	163
Е. А. Вдовиченко, Р. У. Высоцкая. ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННЫХ ВОД КОСТОМУКШСКОГО ГОРНО-ОБОГАТИТЕЛЬНОГО КОМБИНАТА НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПЛОТВЫ	167
Л. В. Ветчинникова, Т. Ю. Кузнецова, А. Ф. Титов. ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА МОРФО- И ОРГАНОГЕНЕЗ БЕРЕЗЫ <i>IN VITRO</i>	174
Н. М. Казнина, А. Ф. Титов, Ю. В. Батова. СОДЕРЖАНИЕ НЕПРОТЕИНОВЫХ ТИОЛОВ В КЛЕТКАХ КОРНЯ ДИКORAСТУЩИХ МНОГОЛЕТНИХ ЗЛАКОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ КАДМИЯ И СВИНЦА	182
О. Н. Лебедева, Т. С. Николаевская, А. Ф. Титов. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СУПРЕССИРОВАННОЙ ТЕМПЕРАТУРОЗАВИСИМОЙ ХЛОРОФИЛЛДЕФЕКТНОСТИ У <i>FESTUCA PRATENSIS</i> HUDS	188
Краткие сообщения	
И. Л. Голованова, Г. А. Урванцева. ВЛИЯНИЕ СВИНЦА НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ КИШЕЧНИКА РЫБ	195
Е. А. Хижкин, В. Д. Юнаш, В. А. Илюха, И. А. Виноградова, А. В. Морозов, Н. Г. Тимейко. ВОСПРОИЗВОДСТВО И ПОЛОВОЕ СОЗРЕВАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОСТОЯННОЙ ТЕМНОТЫ	200
В. К. Болондинский, Л. М. Виликайнен. ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕТОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ ФОТОСИНТЕЗА У КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ И БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ В УСЛОВИЯХ РАЗНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ЭЛЕМЕНТАМИ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ	207
И. А. Нилова, А. Ф. Титов. ДИНАМИКА ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНТЕНСИВНОСТИ ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ	214
Т. Н. Ильина, И. В. Баишникова. СОДЕРЖАНИЕ ВИТАМИНОВ А И Е В КОРКОВОМ И МОЗГОВОМ СЛОЯХ ПОЧЕК МЛЕКОПИТАЮЩИХ	218
А. Р. Унжаков, Н. Н. Тютюнник, Л. Б. Узенбаева, И. В. Баишникова, Е. П. Антонова, Н. П. Чернобровкина, Е. В. Робонен, В. А. Илюха. ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ЩЕНКОВ АМЕРИКАНСКОЙ НОРКИ (<i>MUSTELA VISON</i>) ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКСТРАКТА ИЗ ОБОГАЩЕННОЙ L-АРГИНИНОМ ХВОИ	222
Г. А. Жулай, Е. К. Олейник, П. Н. Кравченко, А. В. Чуров, В. М. Олейник, А. В. Головин, В. А. Толлер, К. А. Островский. АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ПАТОЛОГИЯХ, СОПРОВОЖДАЮЩИХСЯ РАЗВИТИЕМ ИММУННОЙ СУПРЕССИИ	228
Юбилей и даты	
В. А. Илюха. Людмила Борисовна Узенбаева (к 70-летию со дня рождения)	234
А. Л. Рабинович. Римма Ульяновна Высоцкая (к 70-летию со дня рождения)	238
Рецензии и библиография	243
Утраты	
А. Ф. Титов, Н. П. Будыкина, В. В. Таланова. Станислав Николаевич Дроздов (1930–2014)	245
Правила для авторов	247



Труды

КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

№ 5, 2014

transactions.krc.karelia.ru

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные статьи	
И. В. Курбатова, Л. В. Топчиева, Н. Н. Немова. ЦИРКАДНЫЕ ГЕНЫ И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ПАТОЛОГИИ	3
Н. Н. Немова, О. В. Мешерякова, Л. А. Лысенко, Н. Н. Фокина. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ ПО БИОХИМИЧЕСКОМУ СТАТУСУ	18
Л. В. Топчиева, О. М. Федоренко. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ	30
Н. Н. Немова, З. А. Нефедова, С. А. Мурзина. ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ ЛИПИДОВ В РАННЕМ РАЗВИТИИ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ <i>SALMO SALAR</i> L.	44
Экспериментальные статьи	
Е. Н. Икконен, Т. Г. Шибаева, Е. Г. Шерудило, М. И. Сысоева. ФОТОСИНТЕЗ И УСТЫЧНАЯ ПРОВОДИМОСТЬ ЛИСТЬЕВ <i>CUCUMIS SATIVUS</i> L., ИСПЫТАВШИХ ДЛИТЕЛЬНЫЕ ИЛИ ПЕРИОДИЧЕСКИЕ КРАТКОВРЕМЕННЫЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ В РАЗНЫХ ФАЗАХ РОСТА	53
Т. С. Николаевская, О. М. Федоренко. ОСОБЕННОСТИ ОПУШЕНИЯ ЛИСТОВОЙ ПЛАСТИНКИ У РАСТЕНИЙ СЕВЕРНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ <i>ARABIDOPSIS LYRATA</i> SUBSP. <i>PETRAEA</i> И <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	59
А. С. Горюнов, А. Г. Борисова. ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ АВТООКИСЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА В ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЯХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ	71
Л. Б. Узенбаева, И. В. Баишникова, А. Г. Кижина, Т. Н. Ильина, В. А. Илюха, Н. Н. Тютюнник. МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛИСИЦ (<i>VULPES VULPES</i> L.) И ПЕСЦОВ (<i>ALOPEX LAGOPUS</i> L.) ПРИ ВЛИЯНИИ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ВИТАМИНОВ А И Е	78
С. Н. Пеккоева, С. А. Мурзина, З. А. Нефедова, Т. Р. Руоколайнен, П. О. Рипатти, Н. Н. Немова. ЛИПИДНЫЙ СТАТУС БЕЛОМОРСКОЙ СЕЛЬДИ <i>CLUPEA PALLASI MARISALBI</i> BERG ДВИНСКОГО ЗАЛИВА БЕЛОГО МОРЯ В ОСЕННИЙ СЕЗОН	86
В. К. Голованов, Д. С. Капшай. РЕАКЦИИ МОЛОДИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ В УСЛОВИЯХ ПОСТОЯННОГО ПОВЫШЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ВОДЫ	95
Ю. В. Венжик, В. В. Таланова, А. Ф. Титов, Е. А. Мирославов. УЛЬТРАСТРУКТУРА ХЛОРОПЛАСТОВ ПШЕНИЦЫ (<i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.) ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ И ДЕЙСТВИИ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ	102

Карельский научный центр
Российской академии наук

ТРУДЫ

КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

№ 5, 2014

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Петрозаводск
2014

Научный журнал
**Труды Карельского научного центра
Российской академии наук**
№ 5, 2014
Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Scientific Journal
**Proceedings of the Karelian Research Centre
of the Russian Academy of Sciences**
No 5, 2014
EXPERIMENTAL BIOLOGY Series

Главный редактор
А. Ф. ТИТОВ, член-корр. РАН, д. б. н., проф.

Редакционный совет

А. М. АСХАБОВ, академик РАН, д. г.-м. н., проф.; В. Т. ВДОВИЦЫН, к. ф.-м. н., доцент; Т. ВИХАВАЙНЕН, доктор истории, проф.; А. В. ВОРОНИН, д. т. н., проф.; С. П. ГРИППА, к. г. н., доцент; Э. В. ИВАНТЕР, член-корр. РАН, д. б. н., проф.; А. С. ИСАЕВ, академик РАН, д. б. н., проф.; В. Т. КАЛИННИКОВ, академик РАН, д. х. н., проф.; А. М. КРЫШЕНЬ (зам. главного редактора), д. б. н.; Е. В. КУДРЯШОВА, д. флс. н., проф.; В. В. МАЗАЛОВ, д. ф.-м. н., проф.; Ф. П. МИТРОФАНОВ, академик РАН, д. г.-м. н., проф.; И. И. МУЛЛОНЕН, д. фил. н., проф.; Н. Н. НЕМОВА, член-корр. РАН, д. б. н., проф.; В. В. ОКРЕПИЛОВ, академик РАН, д. э. н.; О. Н. ПУГАЧЕВ, член-корр. РАН, д. б. н.; Ю. В. САВЕЛЬЕВ, д. э. н.; Д. А. СУБЕТТО, д. г. н.; Н. Н. ФИЛАТОВ, член-корр. РАН, д. г. н., проф.; В. В. ЩИПЦОВ, д. г.-м. н., проф.

Editor-in-Chief
A. F. TITOV, RAS Corr. Fellow, DSc (Biol.), Prof.

Editorial Council

A. M. ASKHABOV, RAS Academician, DSc (Geol.-Miner.), Prof.; N. N. FILATOV, RAS Corr. Fellow, DSc (Geog.), Prof.; S. P. GRIPPA, PhD (Geog.), Assistant Prof.; A. S. ISAEV, RAS Academician, DSc (Biol.), Prof.; E. V. IVANTER, RAS Corr. Fellow, DSc (Biol.), Prof.; V. T. KALINNIKOV, RAS Academician, DSc (Chem.), Prof.; A. M. KRYSHEN' (Deputy Editor-in-Chief), DSc (Biol.); E. V. KUDRYASHOVA, DSc (Phil.), Prof.; V. V. MAZALOV, DSc (Phys.-Math.), Prof.; F. P. MITROFANOV, RAS Academician, DSc (Geol.-Miner.), Prof.; I. I. MULLONEN, DSc (Philol.), Prof.; N. N. NEMOVA, RAS Corr. Fellow, DSc (Biol.), Prof.; V. V. OKREPILOV, RAS Academician, DSc (Econ.); O. N. PUGACHYOV, RAS Corr. Fellow, DSc (Biol.); Yu. V. SAVELIEV, DSc (Econ.); V. V. SHCHIPTSOV, DSc (Geol.-Miner.), Prof.; D. A. SUBETTO, DSc (Geog.); V. T. VDOVITSYN, PhD (Phys.-Math.), Assistant Prof.; T. VIHAVAINEN, PhD (Hist.), Prof.; A. V. VORONIN, DSc (Tech.), Prof.

Редакционная коллегия серии «Экспериментальная биология»

А. С. ГОРЮНОВ, к. ф.-м. н., доцент; В. А. ИЛЮХА (зам. отв. редактора), д. б. н., доцент; Н. Н. НЕМОВА (отв. редактор), чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.; Н. М. КАЛИНКИНА, д. б. н.; О. Н. ЛЕБЕДЕВА, к. б. н., доцент; Е. М. МАТВЕЕВА, к. б. н.; Л. Л. НОВИЦКАЯ, д. б. н.; Е. К. ОЛЕЙНИК, д. б. н., доцент; Л. П. СМИРНОВ, д. б. н.; Л. В. ТОПЧИЕВА (отв. секретарь), к. б. н.

Editorial Board of the Experimental Biology Series

A. S. GORYUNOV, PhD (Phys.-Math.), Assistant Prof.; V. A. ILYUKHA (Deputy Editor-in-Charge), DSc (Biol.), Assistant Prof.; N. N. NEMOVA (Editor-in-Charge), RAS Corr. Fellow, DSc (Biol.), Prof.; N. M. KALINKINA, DSc (Biol.); O. N. LEBEDEVA, PhD (Biol.), Assistant Prof.; E. M. MATVEEVA, PhD (Biol.); L. L. NOVITSKAYA, DSc (Biol.); E. K. OLEJNIK, DSc (Biol.), Assistant Prof.; L. P. SMIRNOV, DSc (Biol.); L. V. TOPCHIEVA (Executive Secretary), PhD (Biol.).

ISSN 1997-3217 (печатная версия)
ISSN 2312-4504 (онлайн-версия)

Зав. редакцией А. И. Мокеева
Адрес редакции: 185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11
тел. (8142)762018; факс (8142)769600
E-mail: trudy@krc.karelia.ru
Электронная полнотекстовая версия: <http://transactions.krc.karelia.ru>

© Карельский научный центр РАН, 2014

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 575.113, 616.1

ЦИРКАДНЫЕ ГЕНЫ И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ПАТОЛОГИИ

И. В. Курбатова, Л. В. Топчиева, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изложены современные представления о молекулярно-генетических механизмах генерации циркадных ритмов, обобщены данные литературы о связи физиологических функций органов сердечно-сосудистой системы с циркадными ритмами, а также о молекулярно-генетических и биохимических механизмах влияния циркадных генов на развитие сердечно-сосудистых патологий. Проанализированы данные литературы о роли однонуклеотидных замен в циркадных генах в этиологии и патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний.

К л ю ч е в ы е с л о в а: сердечно-сосудистые заболевания, гены циркадного ритма, полиморфизм.

I. V. Kurbatova, L. V. Topchieva, N. N. Nemova. CIRCADIAN GENES AND CARDIOVASCULAR PATHOLOGY

The modern concepts of molecular and genetic mechanisms of circadian rhythms generation are described; the literature on the relationship of physiological functions of the cardiovascular system with circadian rhythms, as well as molecular genetic and biochemical mechanisms of circadian genes influence on the development of cardiovascular pathologies, is reviewed. Published data on the role of single nucleotide substitutions in the circadian genes in the etiology and pathogenesis of cardiovascular diseases are analyzed.

Key words: cardiovascular diseases, circadian genes, polymorphism.

Введение

Биологические ритмы – фундаментальное свойство организмов, обеспечивающее их способность к адаптации и выживанию в циклически меняющихся условиях внешней среды. Центральное место среди ритмических процессов занимает циркадный ритм, он относится к группе ритмов средних частот и имеет

наибольшее значение для организма [Halberg, Reinberg, 1967], поскольку практически все физиологические и биохимические процессы организма подвержены суточным колебаниям [Otto et al., 2004]. Циркадные ритмы организма запрограммированы системой циркадных генов, среди которых особое место занимают гены, кодирующие транскрипционные факторы, например CLOCK и BMAL1 [Voinescu, 2009].

В настоящее время не подвергается сомнению важная роль системы циркадных генов и кодируемых ими белков в регуляции метаболизма. В экспериментах с модельными объектами было показано, что около 10 % транскриптома регулируется циркадными генами в печени [Akhtar et al., 2002], примерно столько же в сердце [Storch et al., 2002] и гипоталамусе [Panda et al., 2002]. Циркадные гены регулируют гены многих ключевых, скорость-лимитирующих ферментов метаболизма [Oishi et al., 2003]. Среди них гены, участвующие в процессах фолдинга и деградации белков, метаболизма глюкозы и липидов [Rudic et al., 2005]. Нарушения молекулярных механизмов регуляции циркадных ритмов, а именно – работы циркадных генов, могут приводить к дисрегуляции метаболических процессов [Marcheva et al., 2010] и развитию ряда патологий, в том числе кардиоваскулярных расстройств [Takeda, Maemura, 2011].

В литературе появляется все больше сведений о том, что мутации в циркадных генах ассоциируются с развитием ряда полигенных заболеваний, таких как рак [Chu et al., 2008], метаболический синдром [Scott et al., 2008], диабет 2 типа [Woon et al., 2007]. Также все чаще циркадные гены рассматриваются как гены-кандидаты, участвующие в этиологии и патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [Curtis et al., 2007; Woon et al., 2007; Anea et al., 2009]. Однако механизмы, посредством которых циркадные гены могут участвовать в развитии сердечно-сосудистых патологий, мало изучены. В данном обзоре приводится имеющаяся в литературе информация о роли циркадных генов в функционировании сердечно-сосудистой системы и формировании ССЗ.

Молекулярно-генетические механизмы генерации циркадных ритмов

Циркадным ритмом млекопитающих управляет супрахиазматическое ядро (СХЯ), расположенное в головном мозге в основании гипоталамуса. СХЯ способно генерировать собственный автономный циркадный ритм, а также подчинять ритму другие системы организма. Под влиянием внешнего освещения СХЯ посредством химических сигналов (цАМФ, протеин-киназа С, глюкокортикоиды, ионы Ca^{2+}) синхронизирует периферические осцилляторы в тканях, вызывая экспрессию генов циркадного ритма, ответственных за цикличность биохимических процессов и запускающих транскрипцию соответствующих генов [Gachon et al.,

2004]. СХЯ передает сигнал в периферические органы и ткани организма, роль посредника в этом процессе выполняет мелатонин эпифиза [Claustrat et al., 2005].

Известно, что часовые механизмы СХЯ и периферических осцилляторов сходны на молекулярном уровне. Они включают сеть транскрипционно-трансляционных циклов обратной связи, в основе которых лежит периодическая 24-часовая экспрессия молекулярных компонентов [Dunlap, 1999]. Основные гены, участвующие в генерации циркадного ритма у млекопитающих, представлены тремя группами [Von Schantz, 2008]:

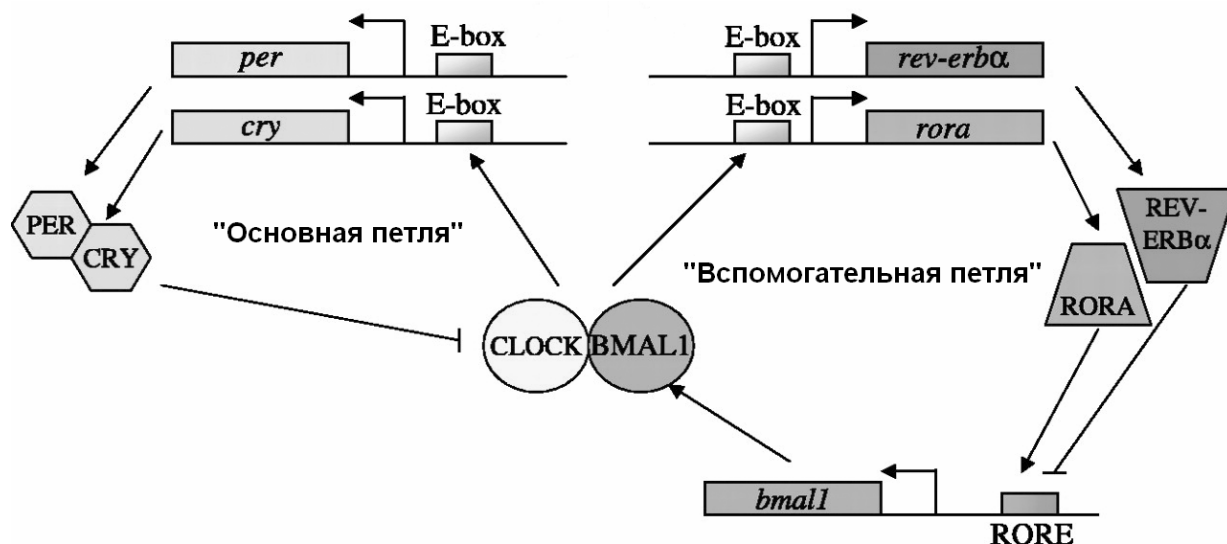
1. Гены первой группы. Кодируют позитивные транскрипционные факторы, содержащие PAS-домены (многофункциональные домены для димеризации белков) и мотив bH-L-H. Мотив bH-L-H содержит основной домен (basic domain) для связывания ДНК и мотив «спираль-петля-спираль» (helix-loop-helix), участвующий в димеризации белков. К позитивным транскрипционным факторам относятся CLOCK и BMAL1.

2. Гены второй группы. Кодируют факторы отрицательной обратной связи с колеблющейся экспрессией, приблизительно с 24-часовым суточным циклом. К этой группе относятся 3 гена *Period* (*Per*) и 2 гена *Cryptochrome* (*Cry*).

3. Гены третьей группы. Кодируют протеинкиназы, действующие на компоненты первых двух групп. Для циркадных систем характерно участие нескольких изоформ казеин-киназы I (CK1), включая CK1 δ и CK1 ϵ [Eide et al., 2002, 2005]. Эти ферменты регулируют стабильность некоторых белковых компонентов циркадных механизмов (например, белков PER1 и PER2) посредством фосфорилирования последних в цитоплазме [Camacho et al., 2001].

Рассмотрим регуляцию экспрессии циркадных генов на уровне транскрипции и участие в ней основных молекулярных компонентов. Условно выделяют две транскрипционные петли [Dickmeis, 2009] (рис.).

«Основная петля». Транскрипционные факторы CLOCK и BMAL1 образуют гетеродимер и связываются с последовательностью E-box генов-мишеней. E-box последовательность признана консенсусной последовательностью узнавания промоторов димером транскрипционных факторов CLOCK:BMAL1 и представляет собой гексануклеотидную последовательность. Транскрипционный фактор, содержащий на N-конце область, обогащенную основными аминокислотами (basic-домен), связывается с E-box последовательностью гена-мишени и регулирует их транскрипцию [Oishi et al., 2003]. Так активируется



Молекулярно-генетический механизм циркадных ритмов [Dickmeis, 2009]

транскрипция генов *Period* и *Cryptochrome*, белковые продукты которых также образуют димер, претерпевают транслокацию из цитоплазмы в ядро, ингибируя активность димера CLOCK:BMAL1. Таким образом, выключается транскрипция генов *per* и *cry*. Посттранскрипционные и посттрансляционные модификации препятствуют накоплению в ядре белков PER и CRY, что приводит к ритмичной активации и репрессии промоторов *Per* и *Cry* с периодом в 24 часа [Takahashi et al., 2008].

«Вспомогательная петля». Димер CLOCK:BMAL1 связывается с E-box промоторов генов *Rev-erba* и *Rora*. RORA и REV-ERB независимо перемещаются в ядро, где конкурируют за связывание с последовательностью одиночного ядерного рецептора, которая носит название RORE-последовательности (AAAGTAGGTCA) в промоторной области *Bmal1*. RORA, связываясь с последовательностью RORE промотора гена *Bmal1*, активирует транскрипцию данного гена. REV-ERB конкурирует с RORA за связывание с сайтом RORE и подавляет транскрипцию *Bmal1*. Антагонистические эффекты RORA и REV-ERB на транскрипцию *Bmal1* генерируют ритмический уровень BMAL1 и, таким образом, CLOCK:BMAL1. Хотя эта вспомогательная петля не существенна для генерации ритма, она вносит определенный вклад в устойчивость и свойства фазового сдвига молекулярных часов [Takahashi et al., 2008].

Описанные авторегуляторные циклы обратной связи генерируют 24-часовой цикл и составляют циркадные молекулярные часы. Большинство часовых компонентов, матричных РНК и белков, колеблются с периодом 24 часа, за исключением CLOCK, CK1δ и CK1ε, которые

являются критическими факторами, регулирующими оборот основных циркадных протеинов у млекопитающих [Von Schantz, 2008].

Обнаружено, что безъядерные клетки – эритроциты – обладают собственной циркадной системой [O'Neill, Reddy, 2011]. Предполагается, что, в отличие от клеток, содержащих ядро, они не используют систему транскрипционно-трансляционных петель обратной связи, однако молекулярные механизмы регуляции циркадных ритмов в безъядерных клетках остаются неизученными.

Под контролем циркадных генов находятся многие биологические процессы организма; так, на мышах показано, что 8–10 % их транскриптома регулируется именно генами циркадных ритмов [Storch et al., 2002]. В последнее время стали известны многие гены-мишени, экспрессия которых регулируется продуктами циркадных генов. В иностранной литературе для обозначения этих генов-мишеней используется выражение «*clock control genes*» («CCG»). Например, исследование транскриптома в аорте мышей показало, что из 7000 проанализированных генов около половины экспрессируются по циркадному типу; среди них гены, участвующие в процессах фолдинга и деградации белков, метаболизма глюкозы и липидов, созревании адипоцитов [Rudic et al., 2005].

Возможны два механизма регуляции экспрессии генов-мишеней циркадными генами. В одном случае белки, кодируемые циркадными генами, непосредственно взаимодействуют с генами-мишенями, связываясь с E-box последовательностями этих генов. Есть сведения, что в эндотелии сосудов экспрессия 29 генов регулируется белками CLOCK и BMAL1

[Maemura et al., 2007]. Димер CLOCK:BMAL1 индуцирует экспрессию генов аргинин-вазопрессина, некоторых транскрипционных факторов [Young, 2006], тромбомодулина [Takeda et al., 2007], ингибитора активатора плазминогена первого типа (PAI-1) в сердечно-сосудистых тканях [Schoenhard et al., 2003], гена Na^+/H^+ -транспортера (*NHE3*) почечного эпителия [Saifur et al., 2005]. Такие пептиды, как аргинин-вазопрессин, трансформирующий фактор роста- α (TGF α), прокинетицин-2 (PK2), секреция которых регулируется циркадными генами, участвуют в процессах внеклеточного сигналинга, контроле поведенческих и нейроэндокринных циклов [Reppert, Weaver, 2002]. Не только позитивные транскрипционные факторы CLOCK и BMAL1 способны напрямую регулировать экспрессию генов-мишеней, но и белки, кодируемые другой группой циркадных генов. Например, белок PER1 участвует в экспрессии гена натриевых каналов *ENaC* [Gumz et al., 2009], белок PER2 участвует в регуляции циркадных колебаний экспрессии гена *PAI-1* [Oishi et al., 2009].

Другой механизм регуляции экспрессии генов-мишеней циркадными генами представляет собой опосредованное влияние на экспрессию генов через транскрипционные факторы, такие как DBP, HLF и TEF, чья экспрессия находится под прямым контролем CLOCK:BMAL1, и bHLH-протеины DEC1 и DEC2, которые координируют каскады экспрессии циркадных генов [Honma et al., 2002]. Например, в печени циркадный протеин DBP регулирует экспрессию цитохромов P450 типов 7a и 2a4 [Hastings et al., 2003].

В последнее время показано, что в регулирование циркадных ритмов на молекулярном уровне включены процессы ремоделирования хроматина. Хотя комплексы CLOCK:BMAL1 связываются с E-бокс последовательностями ДНК генов-мишеней во время всех фаз цикла, активация генной экспрессии зависит от циркадного ремоделирования хроматина [Etchegaray et al., 2003]. Показано, что белок CLOCK обладает активностью ацетилтрансферазы гистонов [Doi et al., 2006]. Гистоновое регулирование является важным механизмом в изменении генной экспрессии сердечной ткани, эти процессы лежат в основе роста, восстановления и ремоделирования [Backs, Olson, 2006].

Таким образом, регуляция циркадных ритмов представляет собой сложную систему взаимодействий многих участников. Приведенный краткий обзор известных данных о механизмах циркадных ритмов свидетельствует о важности, адаптивном значении для организма

и чрезвычайной сложности регуляции эндогенных биологических ритмов. Согласованная организация циркадной системы организма важна для поддержания гомеостаза, и нарушение регуляции циркадного ритма может вносить вклад в развитие заболеваний.

Циркадные гены сердечно-сосудистой системы. Связь физиологических функций органов сердечно-сосудистой системы с циркадными ритмами

Центральный водитель циркадного ритма – СХЯ гипоталамуса – регулирует циркадную периодичность физиологических функций посредством сигналов нервной и гуморальной систем, которые запускают изменения экспрессии генов, являющихся мишенями для циркадных генов. Кроме того, каждый орган имеет свою систему биологических часов, которые называются периферическими часами. Ритмическая экспрессия часовых генов показана в сердце, аорте, почках. Каждая ткань или клетка сердечно-сосудистой системы, включая кардиомиоциты, клетки гладкой мускулатуры, эндотелия, имеет внутренний биологический ритм [Maemura et al., 2007].

Физиологические функции органов сердечно-сосудистой системы тесно связаны с циркадными ритмами. Частота сердечных сокращений, кровяное давление и функционирование эндотелия сосудов изменяются в течение суток. В современном обществе ритм жизни не соответствует внутреннему циркадному ритму организма человека, что приводит к циркадным стрессам, которые могут вносить вклад в этиологию хронических заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых патологий [Rajaratnam, Arendt, 2001]. Нарушение синхронизации между внутренними ритмами и внешними стимулами может вызывать повреждение органов сердечно-сосудистой системы.

В развитие сердечно-сосудистых заболеваний может вносить вклад десинхронизация центральных и периферических часов организма [Takeda, Maemura, 2011]. Об этом свидетельствует тот факт, что у людей, работающих по сменному скользящему графику, повышен риск смерти от ССЗ по сравнению с людьми, работающими по фиксированному графику [Fujino et al., 2006]. Есть предположение, что периферические часы используются сердечно-сосудистой системой для предсказания и подготовки к действию возможных внешних стимулов, таких как повышение кровяного давления в утренние часы. Например, в кардиомиоцитах мышей экспрессируется с циркадной перио-

дичностью натрий-уретический пептид, который выступает в качестве кардиопротективного агента, защищая кардиомиоциты от резкого повышения кровяного давления. Таким образом, десинхронизация центральных и периферических часов организма может осложнять развитие кардиоваскулярных патологий [Takeda, Maemura, 2011].

Имеются сведения об изменениях в системе периферических часов сердечно-сосудистой системы при формировании этих патологий. Например, в гипертрофированном миокарде крыс утрачивается ритмичность экспрессии некоторых циркадных генов (например, генов транскрипционных факторов *Dbp*, *Hlf* и других) [Young et al., 2001b]. В другом исследовании у крыс наблюдалось ослабление ритмичности экспрессии циркадных генов в тех областях сердца, где развивалось ишемическое повреждение [Kung et al., 2007]. Выявлена общая тенденция снижения уровней транскриптов циркадных генов *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в буккальном эпителии у пациентов, страдающих эссенциальной артериальной гипертензией, по сравнению с контролем [Курбатова и др., 2013b].

Показано, что нарушение внутреннего ритма у мышей при содержании в условиях нехарактерного режима освещения приводит к ослаблению работы сердца, но при возвращении к нормальному режиму освещения активность работы сердца восстанавливается. Однако восстановления сердечной активности не происходит у мышей, мутантных по циркадным генам и имеющих внутренний ритм с периодом менее 22 часов [Martino et al., 2007]. Эти результаты свидетельствуют о том, что в развитие сердечно-сосудистых патологий вносит вклад десинхронизация между внутренними ритмами и внешними стимулами. Нормальная организация циркадной системы организма важна для поддержания гомеостаза, и нарушение регуляции циркадного ритма может индуцировать развитие сердечно-сосудистых заболеваний.

Известно, что циркадному ритму подчиняется время, при котором проявляются или обостряются кардиоваскулярные патологии, например, желудочковая тахикардия [Yamashita et al., 1997], геморрагический инфаркт головного мозга [Ricci et al., 1992], инфаркт миокарда [Casetta et al., 2002] и другие. Например, инфаркт миокарда у людей наиболее часто приходится на период с 6.00 до 12.00, наиболее редко – с 3.00 до 6.00. Относительный риск инфаркта миокарда на 40 % выше в утренние часы [Cohen et al., 1997]. Это связано с циркадной активацией сердечно-сосудистой системы

перед пробуждением. Более того, циркадной периодичностью вазодилатации [Elherik et al., 2002], кровяного давления, частоты сердечных сокращений [Rocco et al., 1987] объясняется 9 % всех инфарктов [Cohen et al., 1997]. Установлено, что часы непосредственно после пробуждения являются критическим периодом для патологических нарушений у людей, страдающих ССЗ [Goldberg et al., 1990]. В настоящее время в медицине формируется подход к назначению той или иной терапии, при котором учитываются циркадные ритмы физиологических процессов. Например, известно, что бета-блокаторы, сглаживающие циркадную активацию вегетативной нервной системы, позволяют значительно снизить риск обострения кардиоваскулярных патологий в утренние часы [Onaka et al., 1998]. Разработаны препараты пролонгированного действия для снижения артериального давления, которые принимаются в позднее время суток и действуют в утренние часы [White et al., 2002].

Ряд исследований подтверждают, что синхронизация времени начала патологических сердечно-сосудистых событий связана непосредственно с внутренним циркадным механизмом. Например, в ретроспективном исследовании смертности от сердечного приступа на Гавайях было обнаружено, что пик смертности местных жителей приходится на интервал с 6.00 до 12.00, однако для недавно поселившихся в данном регионе японцев пик смертности приходится на период с 12.00 до 16.00, что соответствует раннему утру в Японии [Couch, 1990].

В настоящее время в ряде исследований показано наличие циркадных генов в различных тканях сердечно-сосудистой системы. Так, Young показал суточное изменение в сердце крыс экспрессии основных часовых генов, таких как *Per* и *Bmal1* [Young, 2003]. Rudic и коллеги изучали генную экспрессию в аорте в условиях циркадной ритмичности и продемонстрировали, что циркадная периодичность характерна для многих генов, участвующих в поддержании структурной целостности сосудов и их метаболизма [Rudic et al., 2005]. Появляются некоторые данные и о механизмах влияния циркадных генов на транскрипционную активность генов клеток миокарда. Оказывается, они могут участвовать в регуляции генной экспрессии сердечной ткани посредством ремоделирования структуры хроматина [Backs, Olson, 2006].

Показано существование циркадных генов в эндотелии и клетках гладкой мускулатуры сосудов [McNamara et al., 2001]. Регуляция сосудистого тонуса и фибринолитической активности в эндотелиальных клетках изменяются

с циркадной периодичностью [Adreotti, Kluff, 1991; Guney et al., 1999]. Эндотелий-зависимая вазодилатация обладает циркадной ритмичностью [Otto et al., 2004]. Кроме того, продемонстрирована роль циркадных генов в функционировании эндотелия. Например, у мышей с мутацией гена *Per2* нарушена эндотелий-зависимая релаксация в ответ на ацетилхолин [Viswambharan et al., 2007]. Также выявлено, что у мышей, мутантных по *Bmal1* и *Clock*, наблюдается дисфункция эндотелия и утрата способности адаптироваться к тромбозу [Anea et al., 2009].

Клетки гладкой мускулатуры сосудов также имеют систему циркадных генов, экспрессия которых индуцируется анафилактическим шоком, ангиотензином II и ретиноевой кислотой [McNamara et al., 2001; Nonaka et al., 2001]. В гладкомышечных клетках сосудов циркадные гены регулируют экспрессию тканевых ингибиторов металлопротеиназ 1 и 3, коллагена 3a1, трансгелина 1 и кальпонина 1 [Maruo et al., 2006]. Показано, что в процессе старения клеток гладкой мускулатуры человека снижается экспрессия циркадных генов. Оказалось, что утрата циркадной периодичности в клетках при старении связана с укорочением теломер и снижением активации протеинов, связывающих цАМФ-чувствительные элементы [Kunieda et al., 2006].

Кардиомиоциты также имеют свою систему циркадных генов [Leibetseder et al., 2009]. Норадреналин индуцирует в кардиомиоцитах циркадную экспрессию изозима 4 киназы пируватдегидрогеназы. Кроме того, циркадными генами регулируется экспрессия транскриптов генов транспортеров глюкозы 1 и 4, гликоген-синтазы мышц и атриального натрий-уретического пептида [Young et al., 2001a]. Обнаружено, что экспрессия генов калиевых каналов также изменяется с циркадной периодичностью [Yamashita et al., 2003]. Показано, что циркадные гены кардиомиоцитов человека регулируют экспрессию некоторых генов, участвующих в метаболизме жирных кислот, триглицеридов и гликогена [Durgan et al., 2006].

В настоящий момент имеются данные литературы по изучению кардиомиоцит-специфической функции циркадных генов. Авторы использовали модель мутантных мышей с измененными часовыми генами, которые экспрессируются специфично в кардиомиоцитах – модель названа авторами «CCM (*Cardiomyocyte-specified Clock Mutant*) mice» [Durgan et al., 2006]. В кардиомиоцитах определено несколько метаболических генов, которые находятся под контролем циркадных генов; в эту группу входят гены, кодирующие регуляторы процессов липолиза (адипонутрин)

и липогенеза (диацилглицерол ацилтрансфераза 2) [Durgan et al., 2006]. Bray с соавторами идентифицировали в кардиомиоцитах предсердий и желудочков соответственно 548 и 176 генов, которые потенциально могут регулироваться периферическими циркадными генами. Среди них гены, участвующие в липогенезе (ген 1-ацилглицерол-3-фосфат-О-ацилтрансферазы), и ген, кодирующий липид-связывающий белок перилипин 4, для которых обнаружена циркадная периодичность [Bray et al., 2008]. В данных исследованиях было установлено, что циркадная периодичность экспрессии идентифицированных генов снижена или утрачена у мутантных мышей по сравнению с контролем. Таким образом, часовые гены кардиомиоцитов влияют на метаболизм триглицеридов миокарда посредством регуляции генов, вовлеченных в процессы липогенеза и липолиза.

Известно, что циркадные гены кардиомиоцитов играют роль в метаболизме жирных кислот [Young, 2006]. Около 70 % жирных кислот утилизируются в сердце. В случае резкого повышения количества жирных кислот в сердце активируются пути метаболизма жирных кислот: окислительный (митохондриальное β -окисление) и неокислительный (синтез триглицеридов, или так называемый «липотоксический» путь) [Allard et al., 1994]. В избытке жирные кислоты могут подавлять сократительную функцию сердца, включаясь в липотоксический путь метаболизма [Young, 2009]. Изменение уровней циркулирующих жирных кислот и липидов имеет четкую циркадную периодичность [Ueberberg et al., 1984]. На грызунах показано, что интенсивность неокислительного пути метаболизма жирных кислот изменяется по циркадному типу; во время фазы сна/освещения наблюдается увеличение синтеза фосфолипидов, диацилглицерола и триацилглицерола. В экспериментах на крысах обнаружено, что избыток жирных кислот в определенное время циркадных суток приводит к подавлению сократительной функции сердца [Durgan et al., 2006, 2007]. Кроме синтеза триглицеридов, циркадные гены регулируют метаболизм гликогена. Содержание гликогена в сердце крыс повышается во время фазы бодрствования/темноты и понижается во время сна/освещения [Durgan et al., 2007].

Таким образом, известные данные позволяют сделать предположение, что система циркадных генов оказывает влияние на метаболизм эндогенных энергетических запасов кардиомиоцитов (триглицериды и гликоген) [Takeda, Maemura, 2010]. Кроме того, было показано, что экспрессия и субклеточное распре-

деление белка CLOCK изменяется в зависимости от фазы сократительного цикла. CLOCK локализован в Z-дисках саркомера и выполняет функцию сенсора активности миофиламентов (энергетического статуса) [Qi, Boateng, 2006].

Механизмы влияния циркадных генов на развитие сердечно-сосудистых патологий

В настоящее время накоплены данные, подтверждающие роль циркадных ритмов в развитии сердечно-сосудистых патологий. Суточным ритмам подвержены вазомоторная активность [Otto et al., 2004], агрегация тромбоцитов [Andrews et al., 1996] и другие показатели, участвующие в процессах тромбоза и тромболизиса. В последнее время появляется все больше сведений о том, что у животных, нокаутных по генам циркадного ритма, в том числе *Clock* и *Bmal1*, формируются фенотипы, связанные с патологией сердечно-сосудистой системы. Например, у нокаутных по гену *Bmal1* и мутантных по интрону 19 гена *Clock* животных наблюдается утрата способности адаптироваться к тромбозу, патологическое ремоделирование сосудов, повышение уровня PAI-1 в крови и снижение экспрессии фосфорилированной NO-синтазы по сравнению с животными дикого типа [Anea et al., 2009]. Lefta и соавторы показали, что у мышей, нокаутных по гену *Bmal1*, с возрастом развивается дилатационная кардиомиопатия, которая связана с изменениями в составе титина (полипептида поперечно-полосатых мышц), изменениями экспрессии гена тяжелой цепи миозина и нарушением структуры саркомера [Lefta et al., 2012]. Также приводятся данные о нарушении суточного ритма артериального давления у модельных животных, нокаутных по циркадным генам. Например, сообщается, что делеция *Bmal1* аннулирует 24-часовой ритм артериального давления посредством снижения продукции катехоламинов, вызывает нарушение симпатoadреналовой функции [Curtis et al., 2007]. Нокаут по другим циркадным генам – *Cry1/2* – приводит к солезависимой гипертензии [Doi et al., 2010].

На основании данных литературы можно выделить ряд механизмов, посредством которых циркадные гены могут вносить вклад в развитие сердечно-сосудистых патологий.

Сердце имеет собственную систему циркадных генов, которая способна участвовать в адаптации к возможным циркадным изменениям физиологических потребностей [Young et al., 2001a]. В настоящее время на мышах показано, что толерантность кардиомиоцитов к ишемическому повреждению может изменяться в зави-

симости от времени суток. У мышей, мутантных по циркадным генам, эта периодичность отсутствует, что указывает на возможную опосредованность таких изменений циркадной системой кардиомиоцитов [Takeda, Maemura, 2011].

In vitro показано, что сократительная функция сердца крыс имеет циркадную периодичность, которая поддерживается циркадными изменениями в окислительном метаболизме. Имеют место изменения циркадных ритмов экспрессии генов-мишеней циркадных генов, участвующих в процессах утилизации углеводов, митохондриального окисления, метаболизма жирных кислот [Young et al., 2001a]. В ходе исследований, проводимых на крысах, установлено, что при экспериментально индуцированной гипертрофии миокарда ослаблена циркадная экспрессия транскрипционного фактора DBP [Young et al., 2001b], а при индуцированной гипертензии наблюдается значительное повышение амплитуды циркадного ритма накопления (синтеза) мРНК-компонентов ренин-ангиотензиновой системы (ренина, ангиотензиногена, АПФ и ангиотензина 1 и 2) [Naito et al., 2002]. В условиях сократительной дисфункции, которая приводит к нарушению циркадной периодичности некоторых генов, сердечная ткань оказывается менее способной подготавливаться к увеличению физиологических потребностей, что способствует метаболическому кризису [Hastings et al., 2003]. Таким образом, один из возможных механизмов, посредством которых циркадные ритмы могут вносить вклад в развитие сердечно-сосудистых патологий, – нарушение в функционировании системы циркадных генов сердца в условиях сократительной дисфункции и, как следствие, изменение циркадных ритмов генов-мишеней.

Другой возможный механизм предполагает влияние циркадных генов на ритм кровяного давления. Известно, что кровяное давление изменяется в течение суток, пик приходится на утренние часы. Изменения в циркадной периодичности кровяного давления вносят вклад в сердечно-сосудистые расстройства. Так, утренний пик артериального давления сохраняется при гипертензии [Lemmer, 1996]. Регулируют суточные изменения кровяного давления внутренние и внешние факторы. К внутренним факторам относятся вегетативная нервная система и гуморальные факторы: кортизол, ренин, альдостерон, вазоактивный интестинальный пептид, атриальный натрий-уретический пептид. Внешние факторы включают физическую активность, эмоциональное состояние, рацион питания и другие [Takeda, Maemura, 2010].

Точные механизмы суточных изменений кровяного давления неизвестны. Однако предполагается влияние внутренних часовых механизмов на ритм кровяного давления. Некоторые гены, связанные с молекулярными часами организма, определяют активность ферментов, вовлеченных в регуляцию артериального давления и плазменных уровней адреналина и норадреналина. *Bmal1*, *Clock* и *Npas2* оказывают специфическое влияние на циркадные изменения артериального давления. Оказалось, что делеция *Bmal1* аннулирует 24-часовой ритм артериального давления посредством снижения продукции катехоламинов, но не влияет на более короткие ультрадианные ритмы. Мутация *Clock* значительно уменьшает и циркадные, и ультрадианные ритмы. У мышей с удаленным *Bmal1* и мутировавшими *Clock* и *Npas2* отмечалось нарушение симпатoadреналовой функции, что указывало на вовлеченность в регуляцию симпатoadреналовой системы молекулярных часов посредством фенилэтанол-амин-N-метилтрансферазы, которая участвует в синтезе катехоламинов, моноаминоксидазы В и катехол-О-метилтрансферазы. Делеция *Bmal1* сглаживала реакцию катехоламинов и артериального давления на стресс независимо от времени суток [Curtis et al., 2007].

В литературе имеются данные об участии рецептора активатора пролиферации пероксисом гамма (PPAR) в регуляции суточного ритма кровяного давления. PPAR экспрессируется в аорте по циркадному типу и, связываясь с промотором *Bmal1*, активирует его транскрипцию. Делеция PPAR в клетках эндотелия и гладкой мускулатуры сосудов приводит к ослаблению суточного ритма кровяного давления [Wang et al., 2008].

Еще один механизм регуляции кровяного давления представляет собой опосредованное влияние циркадных генов на уровень минералокортикоидного гормона альдостерона, который увеличивает реабсорбцию ионов натрия и воды и уменьшает поглощение ионов калия в почках. Уровень альдостерона в плазме изменяется по циркадному типу, пик приходится на период сна. У мышей с нокаутированным геном *Cry1/2* наблюдается постоянно высокий уровень альдостерона. Один из ферментов, участвующих в синтезе альдостерона, 3 β -гидроксил-стероид дегидрогеназа VI, экспрессируется с циркадной периодичностью у мышей с нормальными *Cry1/2*. Однако экспрессия данного фермента у мышей с нокаутированными генами *Cry1/2* постоянно повышена, что приводит к солезависимой гипертензии [Doi et al., 2010]. Альдостерон также регулирует экспрес-

сию альфа-субъединицы натриевых каналов почечного эпителия, что может быть опосредовано регуляцией уровня экспрессии гена *Per1* [Gumz et al., 2009]. Мутации в циркадных генах вызывают изменения в гомеостазе водно-солевого обмена. Например, показано, что экспрессия гена *NHE3* (Na⁺/H⁺-транспортера почечного эпителия) регулируется непосредственно гетеродимерами CLOCK:BMAL1, которые связываются с промотором гена *NHE3* [Saifur et al., 2005].

В настоящее время установлено, что один из важнейших компонентов ренин-ангиотензиновой системы, регулирующей кровяное давление, – ангиотензин II – индуцирует в клетках гладкой мускулатуры мышей значительное повышение уровня экспрессии *Per2*. Этот эффект устраняется специфическими антагонистами рецептора I типа ангиотензина II. Есть предположение, что ангиотензин II может быть одним из факторов, регулирующих биологические функции посредством изменения уровня экспрессии циркадных генов в аорте, почках и сердце. Колебания экспрессии часовых генов под влиянием ангиотензина II могут быть ответом на изменения средовых факторов и в свою очередь могут привести к патологическим процессам в сосудах, лежащим в основе кардиоваскулярных расстройств [Nonaka et al., 2001].

Другие регуляторы циркадной экспрессии в гладкой мускулатуре сосудов, сердце и аорте – ретиноевая кислота и глюкокортикоиды. Например, ретиноевая кислота влияет на экспрессию генов, регулируемую комплексами CLOCK:BMAL1 и NPAS2:BMAL1. К таким генам относится ген транскрипционного фактора DBP, который участвует в регуляции сосудистого тонуса, однако механизм регуляции до сих пор точно не выяснен [Hastings et al., 2003].

Показано, что *in vivo* эндотелий участвует в поддержании циркадной периодичности эндотелий-зависимой дилатации артериальной стенки [Gaenzer et al., 2000] и вазодилатации в коже [Elherik et al., 2002], которые также показывают пик в утренние часы. Известно, что в регуляции сосудистого тонуса участвуют эндотелины, которые являются сильными вазоконстрикторами [Elherik et al., 2002], в культуре фибробластов эндотелин-1 индуцирует экспрессию генов *Per* [Yagita et al., 2001]. На мышах показано, что мутация в гене *Per2* приводит к нарушению эндотелий-зависимой вазодилатации из-за снижения синтеза оксида азота [Viswambharan et al., 2007]. Таким образом, молекулярные часы могут влиять на временные особенности сердечно-сосудистых событий не только посредством регулирования ве-

личины утреннего повышения артериального давления, но также и степени прессорного ответа на воздействие окружающей среды, непосредственно обусловленного временем суток.

Большинство результатов, указывающих на роль циркадных ритмов в изменении кровяного давления, получено в исследованиях на грызунах. До сих пор до конца не ясно, каким образом циркадные ритмы участвуют в регуляции кровяного давления у человека. Данные литературы противоречивы. У людей в условиях 26-часового освещения наблюдается циркадный ритм частоты сердечных сокращений, в то время как циркадный ритм кровяного давления не показан [Kerkhof et al., 1998]. В другом исследовании продемонстрирован вклад циркадных ритмов в суточное изменение кровяного давления. Показано, что циркадная система модулирует активность симпатической нервной системы, уровень кортизола, артериальное давление, частоту сердечных сокращений и агрегацию тромбоцитов [Scheer et al., 2010]. Кроме того, обнаружено, что десинхронизация, вызванная 28-часовыми интервалами освещения, вызывает гипертензию [Scheer et al., 2009].

Другой возможный механизм развития сердечно-сосудистых патологий, связанный с циркадными ритмами, – нарушение баланса между важными метаболическими процессами, такими как процессы потребления и запасаения кислорода, и процессами коагуляции и фибринолиза. Этот баланс поддерживается регуляцией циркадной периодичности активности вегетативной нервной системы, сосудистого тонуса и процессов коагуляции и фибринолиза, и нарушение данной регуляции лежит в основе развития инфаркта миокарда в утренние часы. Инфаркт миокарда чаще всего происходит ранним утром. Множество функций сердечно-сосудистой системы, связанных с патогенезом инфаркта миокарда, изменяются в соответствии с циркадными ритмами. Соответствие времени развития инфарктов миокарда циркадному ритму связано с суточными изменениями активности вегетативной нервной системы. Ранним утром повышаются систолическое артериальное давление, частота сердечных сокращений, приводя к увеличению потребления кислорода сердцем. С другой стороны, растёт сосудистый тонус коронарной артерии, и кровоток в ней уменьшается. Это несоответствие потребления и запасаения кислорода приводит к развитию инфаркта миокарда. О роли вегетативной нервной системы свидетельствует то, что развитие инфаркта миокарда в соответствии с циркадным ритмом не выявлено у паци-

ентов, принимающих β -блокаторы, и у диабетиков с дисфункцией вегетативной нервной системы [Willich et al., 1989].

Кроме того, гиперкоагуляция в утренние часы также может лежать в основе развития инфарктов миокарда в это время суток. На мышах проводилась тромботическая окклюзия сосудов посредством фотохимического повреждения, *in vivo* была показана суточная периодичность процесса тромбогенеза [Westgate et al., 2008]. Известно, что количество циркулирующих тромбоцитов и их активность изменяются по циркадному типу [Undar et al., 1999], пик тромбообразования приходится на утренние часы [Kurnik, 1996]. Тромбоциты активируются катехоламинами, ритмическая активация вегетативной нервной системы также может индуцировать колебания в их активности. Помимо этого, циркадную периодичность имеет коагуляционная активность. Так, содержание в плазме фактора свертывания VII колеблется в течение суток. Как известно, повышение его концентрации в крови является фактором риска развития ишемической болезни сердца [Manfredini et al., 2005]. Другие факторы коагуляции, такие как фибриноген, протромбин, тромбомодулин, фактор VIII, также подвержены циркадной активации [Pinotti et al., 2005]. Например, экспрессия тромбомодулина в эндотелии сосудов изменяется периодически по циркадному типу. Регулирует этот процесс гетеродимер CLOCK:BMAL2, который связывается с E-box последовательностями промотора тромбомодулина и активирует его транскрипцию. Уровень мРНК и белка тромбомодулина имеют четкую циркадную периодичность в легких и сердце мышей, пик приходится на ночное время [Takeda et al., 2007]. Тромбомодулин ингибирует функционирование тромбина и реактивного белка C, защищая эндотелий от гиперкоагуляции, которая индуцируется PAI-1 [Van de Wouwer et al., 2004].

Коагуляционный процесс может быть нарушен активацией фибринолитического процесса, который ослабляет коагуляцию и препятствует формированию тромбов. Однако фибринолитическая функция ослаблена в утренние часы. PAI-1 является основным антагонистом тканевого активатора плазминогена и первичным регулятором фибринолитического каскада, его активность и концентрация мРНК показывают циркадное изменение с пиком в утренние часы [Hoekstra et al., 2002] в соответствии с повышенным риском инфаркта миокарда в это время [Cohen et al., 1997]. Предполагается, что это связано с основным молекулярным часовым механизмом. Например, такие компоненты цир-

кадной системы, как димер CLOCK:BMAL1 [Schoenhard et al., 2003] и PERIOD2 [Oishi et al., 2009], участвуют в регуляции циркадных колебаний экспрессии гена *PAI-1* в сердечно-сосудистых тканях. Известно, что ритмичность экспрессии гена *PAI-1* ослаблена в сердце мышей, мутантных по гену *Clock* [Minami et al., 2002]. Концентрация и активность PAI-1 изменяются в соответствии с циркадной периодичностью, и пик приходится на утренние часы, что приводит к понижению активности тканевого активатора плазминогена в это время суток. Следовательно, эффективность терапии с применением тканевого активатора плазминогена у пациентов, перенесших инфаркт миокарда, зависит от времени суток [Kurnik, 1996].

Таким образом, нарушение баланса между важными метаболическими процессами, такими как процессы потребления и запасаения кислорода и процессы коагуляции и фибринолиза, лежит в основе развития инфаркта миокарда в утренние часы.

Полиморфизм циркадных генов и риск развития сердечно-сосудистых заболеваний

В последнее десятилетие циркадные гены стали рассматриваться в качестве генов-кандидатов, которые могут вносить вклад в сердечно-сосудистые патологии. Однако популяционные исследования, касающиеся изучения роли однонуклеотидных замен в генах циркадных ритмов в развитии ССЗ, малочисленны. Так, показана ассоциация с развитием гипертензии одной из мутаций гена *NPAS2* в финской популяции [Englund et al., 2009]. Другими авторами обнаружена ассоциация мутации в интроне гена *BMAL1* с развитием артериальной гипертензии у жителей Великобритании [Woon et al., 2007]. Проведено исследование распределения частот аллелей и генотипов по полиморфным маркерам генов *CLOCK* и *BMAL1* в российской популяции (у жителей Республики Карелия) и установлена связь между полиморфными маркерами 3111TC (3'-нетранслируемой области), 862TC (экзона 9) и 257TG (промоторной области) гена *CLOCK* и развитием эссенциальной артериальной гипертензии (ЭАГ) (I-II стадии, степень АГ 1-2) и ишемической болезни сердца (ИБС) (острого инфаркта миокарда (ОИМ)). Повышение риска развития ЭАГ и ИБС характерно для мужчин, имеющих генотип CC по маркерам 3111TC, 862TC и генотип GG по маркеру 257TG гена *CLOCK*; и для женщин, имеющих генотип CC по маркеру 862TC и генотип GG по маркеру 257TG гена *CLOCK* [Курбатова и др., 2012б].

Нужно отметить, что результаты по оценке связи определенных вариантов генов циркадных ритмов с развитием ССЗ противоречивы. Так, ассоциация однонуклеотидной замены 56445TC в интроне гена *BMAL1* с развитием артериальной гипертензии, обнаруженная в популяции жителей Великобритании [Woon et al., 2007], не была зафиксирована у жителей России (Республики Карелия) [Курбатова, 2013]. Как известно, значительную роль в реализации генетических составляющих при возникновении и развитии полигенных заболеваний могут играть социальные, экономические, экологические факторы, во многом зависящие от региона проживания, и этническая принадлежность. Поэтому для населения определенных регионов удастся обнаружить ассоциацию вариантов генов-кандидатов с развитием ССЗ, а для других – нет.

Наличие в геноме определенных вариантов генов может обуславливать восприимчивость или устойчивость к болезни (что называется «генетической предрасположенностью») и определять тяжесть или прогрессирование заболевания. Особенно это важно в случае мультифакториальных, в частности сердечно-сосудистых, заболеваний. В связи с этим особую важность имеют исследования по изучению роли полиморфизма генов циркадного ритма в этиологии и патогенезе ССЗ.

Одним из молекулярных механизмов влияния полиморфных вариантов циркадных генов на развитие ССЗ является изменение транскрипционной активности генов, обусловленное наличием однонуклеотидных замен в регуляторных областях. Например, в настоящее время показано значимое снижение экспрессии основных циркадных генов *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* у носителей генотипов повышенного риска развития ЭАГ и ИБС по полиморфным маркерам 3111TC и 257TG регуляторных областей гена *CLOCK* [Курбатова и др., 2012а]. Снижение экспрессии основных циркадных генов может приводить к нарушению механизмов регуляции системы циркадных генов, что в свою очередь способно повлиять на экспрессию генов-мишеней. Так, доказано, что наличие однонуклеотидных замен в гене *CLOCK* может приводить к изменению уровней транскриптов не только самих циркадных генов, но и генов-мишеней, например, гена *PAI-1* [Курбатова и др., 2013а]. По данным литературы, вероятные механизмы вовлечения в патогенез ССЗ однонуклеотидных замен в циркадных генах включают не только изменение уровней транскриптов циркадных генов (изменения

на транскрипционном уровне), но и влияние структурных изменений в нетранслируемых областях гена на связывание с регуляторными молекулами [Dong et al., 2011; Wang et al., 2011], стабильность и локализацию мРНК (изменения на посттранскрипционном уровне) [Mignone et al., 2002; Woo et al., 2009].

Кроме данных по изучению молекулярно-генетических механизмов влияния однонуклеотидных замен в генах циркадного ритма на развитие ССЗ в литературе представлены также результаты ряда исследований, касающихся изучения биохимических механизмов этой взаимосвязи. Однако следует отметить, что в большинстве работ по изучению биохимических механизмов связи вариантов циркадных генов с развитием полигенных, в частности сердечно-сосудистых, заболеваний рассматриваются отдельные биохимические показатели [Tsuzaki et al., 2010]. Кроме того, в основном эти работы выполнены зарубежными авторами с привлечением модельных объектов с мутантными, нокаутированными или делетированными генами [Anea et al., 2009; Doi et al., 2010; Somanath et al., 2011]. При рассмотрении в качестве объекта исследования человека задача по изучению биохимических механизмов связи вариантов циркадных генов с фенотипом (развитием заболевания) реализуется исследователями с помощью оценки ассоциации определенных вариантов гена с тем или иным биохимическим показателем. Например, при исследовании жителей Финляндии было выявлено, что однонуклеотидный полиморфизм в гене *PER2* ассоциируется с изменениями концентрации глюкозы в плазме, причем у носителей минорного аллеля снижен риск повышения содержания глюкозы в крови. В то же время различий в содержании в плазме крови холестерина липопротеинов низкой плотности у носителей разных генотипов по данному полиморфному маркеру не обнаружено [Englund et al., 2009]. В японской популяции человека была обнаружена связь однонуклеотидной замены 3111TC гена *CLOCK* с содержанием липопротеинов низкой плотности [Tsuzaki et al., 2010].

Кроме того, впервые было проведено исследование комплекса биохимических показателей плазмы крови носителей разных генотипов по полиморфным маркерам генов *CLOCK* и *BMAL1*, страдающих ЭАГ (I-II стадии, степень АГ 1-2), и людей без клинических проявлений данного заболевания. Были проанализированы такие биохимические показатели, как: уровень мелатонина, АКТГ, кортизола, альдостерона, АПФ, тестостерона, PAI-1 и липидов в плазме крови. Показано, что в зависимости от геноти-

па по маркерам, ассоциированным с риском развития ЭАГ и ИБС, различаются уровни гормонов (мелатонина, АКТГ, тестостерона), содержание в крови одного из важнейших регуляторов фибринолиза (PAI-1) и уровни атерогенных и антиатерогенных фракций липидов [Курбатова и др., 2012в; Курбатова, 2013].

Обобщая данные литературы, следует подчеркнуть важность исследования роли вариантов циркадных генов в этиологии и патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Поиск новых полиморфных маркеров циркадных генов, перспективных в отношении их использования для оценки предрасположенности к ССЗ, а также изучение молекулярно-генетических и биохимических механизмов влияния полиморфных вариантов на развитие данных заболеваний чрезвычайно важны для разработки основ профилактической медицины.

Заключение

Таким образом, на основании данных литературы можно сделать вывод о том, что механизмы, посредством которых циркадные гены могут вносить вклад в развитие сердечно-сосудистых патологий, сложны и разнообразны. При этом можно выделить следующие основные механизмы. В условиях сократительной дисфункции нарушение в функционировании системы циркадных генов сердца и, как следствие, изменение циркадных ритмов генов-мишеней приводит к изменениям в окислительном метаболизме. Другой возможный механизм предполагает влияние системы циркадных генов и их продуктов на ритм кровяного давления. Установлено, что циркадная система модулирует активность симпатической нервной системы, уровень кортизола и других гуморальных факторов, а также активность ферментов, участвующих в регуляции артериального давления. Предположение о другом возможном механизме опирается на сведения о связи между активностью вегетативной нервной системы, сосудистым тонусом и циркадной периодичностью кровяного давления. Циркадная система посредством генов-мишеней регулирует периодичность активности вегетативной нервной системы, сосудистого тонуса, тромболитической активности, и нарушение данной регуляции может приводить к дисбалансу между важными метаболическими процессами, такими как процессы потребления и запасания кислорода и процессы коагуляции и фибринолиза.

Раскрыты некоторые механизмы, посредством которых однонуклеотидные замены в циркадных генах вносят вклад в развитие сер-

дечно-сосудистых заболеваний. Мутации в генах циркадного ритма могут привести к изменениям на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, а также обуславливать изменение уровней некоторых биохимических показателей плазмы крови, в частности уровней гормонов, регуляторов фибринолиза и уровни атерогенных и антиатерогенных фракций липидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.», № г. р. 01201056445, ГК № 02.740.11.0700; программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине»; гранта Президента РФ «Ведущие научные школы РАН» НШ-3731.2010.4; гранта Правительства РФ по постановлению № 220 (вед. ученый А. Н. Полтораки); гранта Российского фонда фундаментальных исследований 12-04-31368 мол_а.

Литература

- Курбатова И. В. Роль вариантов генов циркадных ритмов *CLOCK* и *BMAL1* в изменении биохимических показателей при развитии эссенциальной артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2013. 24 с.
- Курбатова И. В., Коломейчук С. Н., Топчиева Л. В. и др. Экспрессия генов циркадных ритмов *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в клетках буккального эпителия человека в зависимости от полиморфных вариантов гена *CLOCK* // Доклады академии наук. 2012а. Т. 446, № 6. С. 703–706.
- Курбатова И. В., Топчиева Л. В., Коломейчук С. Н. и др. Полиморфные маркеры гена транскрипционного фактора *CLOCK* и риск возникновения эссенциальной артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца у жителей Республики Карелия // Актуальные проблемы лабораторной диагностики и биотехнологии: сб. тез. Всерос. науч.-практ. конф. (Кемерово, 13–14 сентября 2012 г.). Кемерово, 2012б. С. 51–52.
- Курбатова И. В., Топчиева Л. В., Коломейчук С. Н. и др. Риск возникновения эссенциальной артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца и некоторые биохимические показатели крови у носителей разных генотипов по полиморфным маркерам гена *CLOCK* (жителей Республики Карелия) // Медицинский академический журнал. 2012в. Т. 12, № 4. С. 29–31.
- Курбатова И. В., Топчиева Л. В., Корнева В. А. и др. Содержание PAI-1 в плазме крови и уровень транскриптов гена *PAI-1* в клетках буккального эпителия доноров контрольной группы и пациентов с диагнозом ЭАГ в зависимости от полиморфных вариантов генов *CLOCK* и *BMAL1* // Медицина в XXI веке: традиции и перспективы: Сб. трудов II Межд. интернет-конф. (Казань, 19–20 апреля 2013 г.). Казань, 2013а. С. 9–16.
- Курбатова И. В., Топчиева Л. В., Корнева В. А. и др. Экспрессия генов циркадного ритма *CLOCK*, *BMAL1* и *PER1* в клетках буккального эпителия у больных эссенциальной артериальной гипертензией // Медицинская генетика. 2013б. № 4. С. 27–31.
- Adreotti F., Kluff C. Circadian variation of fibrinolytic activity in blood // Chronobiol. Int. 1991. Vol. 8, N 5. P. 336–351.
- Akhtar R. A., Reddy A. B., Maywood E. S. et al. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus // Curr. Biol. 2002. Vol. 12, N 7. P. 540–550.
- Allard M. F., Schonekess B. O., Henning S. L. et al. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts // Am. J. Physiol. 1994. Vol. 267, N 2. Part 2. P. 742–750.
- Andrews N. P., Gralnick H. R., Merryman P. et al. Mechanisms underlying the morning increase in platelet aggregation: a flow cytometry study // J. Am. Coll. Cardiol. 1996. Vol. 28, N 7. P. 1789–1795.
- Anea C. B., Zhang M., Stepp D. W. et al. Vascular disease in mice with a dysfunctional circadian clock // Circulation. 2009. Vol. 119, N 11. P. 1510–1517.
- Backs J., Olson E. N. Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation // Circ. Res. 2006. Vol. 98, N 1. P. 215–224.
- Bray M. S., Shaw C. A., Moore M. W. et al. Disruption of the circadian clock within the cardiomyocyte influences myocardial contractile function, metabolism, and gene // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2008. Vol. 294, N 2. P. 1036–1047.
- Camacho F., Cilio M., Guo Y. et al. Human casein kinase I delta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2 // FEBS Lett. 2001. Vol. 489, N 2–3. P. 159–165.
- Casetta I., Granieri E., Portaluppi F. et al. Circadian variability in hemorrhagic stroke // J. Am. Med. Assoc. 2002. Vol. 287, N 10. P. 1266–1267.
- Chu L. W., Zhu Y., Yu K. et al. Variants in circadian genes and prostate cancer risk: a population-based study in China // Prostate Cancer Prostatic Dis. 2008. Vol. 11, N 4. P. 342–348.
- Claustrat B., Brun J., Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin // Sleep Med. Rev. 2005. Vol. 9, N 1. P. 11–24.
- Cohen M. C., Rohtla K. M., Lavery C. E. et al. Meta-analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death // Am. J. Cardiol. 1997. Vol. 79, N 11. P. 1512–1516.
- Couch R. D. Travel, time zones, and sudden cardiac death. Empiric pathology // Am. J. Forensic. Med. Pathol. 1990. Vol. 11, N 2. P. 106–111.
- Curtis A. M., Cheng Y., Kapoor S. et al. Circadian variation of blood pressure and the vascular response to asynchronous stress // PNAS. 2007. Vol. 104, N 9. P. 3450–3455.
- Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock // J. Endocrinol. 2009. Vol. 200, N 1. P. 3–22.
- Doi M., Hirayama J., Sassone-Corsi P. Circadian regulator *CLOCK* is a histone acetyltransferase // Cell. 2006. Vol. 125, N 3. P. 497–508.

- Doi M., Takahashi Y., Komatsu R. et al. Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient *Cry*-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6 // *Nat. Med.* 2010. Vol. 16, N 1. P. 67–74.
- Dong L., Bilbao A., Laucht M. et al. Effects of the circadian rhythm gene *Period 1 (Per1)* on psychosocial stress-induced alcohol drinking // *Am. J. Psychiatry.* 2011. Vol. 168, N 10. P. 1090–1098.
- Dunlap J. C. Molecular bases for circadian clocks // *Cell.* 1999. Vol. 96, N 2. P. 271–290.
- Durgan D. J., Moore M. W., Ha N. P. et al. Circadian rhythms in myocardial metabolism and contractile function: influence of workload and oleate // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007. Vol. 293, N 4. P. 2385–2393.
- Durgan D. J., Trexler N. A., Egbejimi O. et al. The circadian clock within the cardiomyocyte is essential for responsiveness of the heart to fatty acids // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, N 34. P. 24254–24269.
- Eide E. J., Vielhaber E. L., Hinz W. A. et al. The Circadian regulatory proteins BMAL1 and Cryptochromes are substrates of casein kinase I // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, N 19. P. 17248–17254.
- Eide E. J., Woolf M. F., Kang H. et al. Control of mammalian circadian rhythm by CKI-regulated proteasome-mediated PER2 degradation // *Mol. Cell Biol.* 2005. Vol. 25, N 7. P. 2795–2807.
- Elherik K., Khan F., McLaren M. et al. Circadian variation in vascular tone and endothelial cell function in normal males // *Clin. Sci. (Lond.).* 2002. Vol. 102, N 5. P. 547–552.
- Englund A., Kovanen L., Saarikoski S. T. et al. *NPAS2* and *PER2* are linked to risk factors of the metabolic syndrome // *J. Circadian Rhythms.* 2009. Vol. 7, N 5. P. 1–9.
- Etchegaray J. P., Lee C., Wade P. A. et al. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock // *Nature.* 2003. Vol. 421, N 6919. P. 177–182.
- Fujino Y., Iso H., Tamakoshi A. et al. Prospective cohort study of shift work and risk of ischemic heart disease in Japanese male workers // *Am. J. Epidemiol.* 2006. Vol. 164, N 2. P. 128–135.
- Gachon F., Nagoshi E., Brown S. A. et al. The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology // *Chromosoma.* 2004. Vol. 113, N 3. P. 103–112.
- Gaenzer H., Sturm W., Kirchmair R. et al. Circadian variation of endothelium-dependent vasodilatation of the brachial artery as a confounding factor in the evaluation of endothelial function // *Atherosclerosis.* 2000. Vol. 149, N 1. P. 227–228.
- Goldberg R. J., Brady P., Muller J. E. et al. Time of onset of symptoms of acute myocardial infarction // *Am. J. Cardiol.* 1990. Vol. 66, N 2. P. 140–144.
- Gumz M. L., Stow L. R., Lynch I. J. et al. The circadian clock protein *Period 1* regulates expression of the renal epithelial sodium channel in mice // *J. Clin. Invest.* 2009. Vol. 119, N 8. P. 2423–2434.
- Guney H. Z., Uluoglu C., Hodoglugil U. et al. Biological-time-dependent differences in effect of verapamil on rat aorta and influence of endothelium // *Chronobiol. Int.* 1999. Vol. 16, N 6. P. 779–787.
- Halberg F., Reinberg A. Rythmes circadian a rythmes de basses frequences en physiologie humaine // *J. Physiol. (Paris).* 1967. Vol. 59. P. 117–200.
- Hastings M. H., Reddy A. B., Maywood E. S. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease // *Nature Rev. Neurosci.* 2003. Vol. 4, N 8. P. 649–661.
- Hoekstra T., Geleijnse J. M., Schouten E. G. et al. Diurnal variation in PAI-1 activity predominantly confined to the 4G-allele of the *PAI-1* gene // *Thromb. Haemost.* 2002. Vol. 88, N 5. P. 794–798.
- Honma S., Kawamoto T., Takagi Y. et al. DEC1 and DEC2 are regulators of the mammalian molecular clock // *Nature.* 2002. Vol. 419, N 6909. P. 841–844.
- Kerkhof G. A., Van Dongen H. P., Bobbert A. C. Absence of endogenous circadian rhythmicity in blood pressure? // *Am. J. Hypertens.* 1998. Vol. 11, N 3. Pt. 1. P. 373–377.
- Kung T. A., Egbejimi O., Cui J. et al. Rapid attenuation of circadian clock gene oscillations in the rat heart following ischemia-reperfusion // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2007. Vol. 43, N 2. P. 744–753.
- Kunieda T., Minamino T., Katsuno T. et al. Cellular senescence impairs circadian expression of clock genes *in vitro* and *in vivo* // *Circ. Res.* 2006. Vol. 98, N 4. P. 532–539.
- Kurnik P. B. Practical implications of circadian variations in thrombolytic and antithrombotic activities // *Cardiol. Clin.* 1996. Vol. 14, N 2. P. 251–262.
- Lefta M., Campbell K. S., Feng H. Z. et al. Development of dilated cardiomyopathy in *Bmal1*-deficient mice // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012. Vol. 303, N 4. H475–485.
- Leibetseder V., Humpeler S., Svoboda M. et al. Clock genes display rhythmic expression in human hearts // *Chronobiol. Int.* 2009. Vol. 26, N 4. P. 621–636.
- Lemmer B. Chronopharmacology of hypertension // *Ann. NY Acad. Sci.* 1996. Vol. 783. P. 242–253.
- Maemura K., Takeda N., Nagai R. Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: role of the biological clock in cardiovascular diseases // *J. Pharmacol. Sci.* 2007. Vol. 103, N 2. P. 134–138.
- Manfredini R., Boari B., Smolensky M. H. et al. Circadian variation in stroke onset: identical temporal pattern in ischemic and hemorrhagic events // *Chronobiol. Int.* 2005. Vol. 22, N 3. P. 417–453.
- Marcheva B., Ramsey K. M., Buhr E. D. et al. Disruption of the clock components *CLOCK* and *BMAL1* leads to hypoinsulinaemia and diabetes // *Nature.* 2010. Vol. 466, N 7306. P. 627–631.
- Martino T. A., Tata N., Belsham D. D. et al. Disturbed diurnal rhythm alters gene expression and exacerbates cardiovascular disease with rescue by resynchronization // *Hypertension.* 2007. Vol. 49, N 5. P. 1104–1113.
- Maruo T., Nakatani S., Kanzaki H. et al. Circadian variation of endothelial function in idiopathic dilated cardiomyopathy // *Am. J. Cardiol.* 2006. Vol. 97, N 5. P. 699–702.
- McNamara P., Seo S. B., Rudic R. D. et al. Regulation of *CLOCK* and *MOP4* by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock // *Cell.* 2001. Vol. 105, N 7. P. 877–889.

- Mignone F., Gissi C., Liuni S. et al. Untranslated regions of mRNAs // *Genome Biol.* 2002. Vol. 3, N 3, reviews 0004. P. 1–10.
- Minami Y., Horikawa K., Akiyama M. et al. Restricted feeding induces daily expression of clock genes and *Pai-1* mRNA in the heart of *Clock* mutant mice // *FEBS Lett.* 2002. Vol. 526, N 1–3. P. 115–118.
- Naito Y., Tsujino T., Fujioka Y. et al. Augmented diurnal variations of the cardiac rennin-angiotensin system in hypertensive rats // *Hypertension.* 2002. Vol. 40, N 6. P. 827–833.
- Nonaka H., Emoto N., Ikeda K. et al. Angiotensin II induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells // *Circulation.* 2001. Vol. 104, N15. P. 1746–1748.
- O'Neill J. S., Reddy A. B. Circadian clocks in human red blood cells // *Nature.* 2011. Vol. 469, N 7331. P. 498–503.
- Oishi K., Miyazaki K., Kadota K. et al. Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, N 42. P. 41519–41527.
- Oishi K., Miyazaki K., Uchida D. et al. PERIOD2 is a circadian negative regulator of *PAI-1* gene expression in mice // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2009. Vol. 46, N 4. P. 545–552.
- Onaka H., Hirota Y., Shimada S. et al. Circadian variation of myocardial ischemia in patients with unstable angina pectoris secondary to fixed and/or spastic coronary narrowing // *Am. J. Cardiol.* 1998. Vol. 81, N 5. P. 629–632.
- Otto M. E., Svatikova A., Barretto R. B. et al. Early morning attenuation of endothelial function in healthy humans // *Circulation.* 2004. Vol. 109, N 21. P. 2507–2510.
- Panda S., Antoch M. P., Miller B. H. et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock // *Cell.* 2002. Vol. 109, N 3. P. 307–320.
- Pinotti M., Bertolucci C., Portaluppi F. et al. Daily and circadian rhythms of tissue factor pathway inhibitor and factor VII activity // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005. Vol. 25, N 3. P. 646–649.
- Qi L., Boateng S. Y. The circadian protein Clock localizes to the sarcomeric Z-disk and is a sensor of myo lament cross-bridge activity in cardiac myocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. Vol. 351, N 4. P. 1054–1059.
- Rajaratnam S. M., Arendt J. Health in a 24-h society // *Lancet.* 2001. Vol. 358, N 9286. P. 999–1005.
- Reppert S. M., Weaver D. R. Coordination of circadian timing in mammals // *Nature.* 2002. Vol. 418, N 6901. P. 935–941.
- Ricci S., Celani M. G., Vitali R. et al. Diurnal and seasonal variations in the occurrence of stroke: a community-based study // *Neuroepidemiology.* 1992. Vol. 11, N 2. P. 59–64.
- Rocco M. B., Nabel E. G., Selwyn A. P. Circadian rhythms and coronary artery disease // *Am. J. Cardiol.* 1987. Vol. 59, N 7. P. 13–17.
- Rudic R. D., McNamara P., Reilly D. et al. Bioinformatic analysis of circadian gene oscillation in mouse aorta // *Circulation.* 2005. Vol. 112, N 17. P. 2716–2724.
- Saifur R. M., Emoto N., Nonaka H. et al. Circadian clock genes directly regulate expression of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 in the kidney // *Kidney Int.* 2005. Vol. 67, N 4. P. 1410–1419.
- Scheer F. A., Hilton M. F., Mantzoros C. S. et al. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. Vol. 106, N 11. P. 4453–4458.
- Scheer F. A., Hu K., Evoniuk H. et al. Impact of the human circadian system, exercise, and their interaction on cardiovascular function // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107, N 47. P. 20541–20546.
- Schoenhard J. A., Smith L. H., Painter C. A. et al. Regulation of the *PAI-1* promoter by circadian clock components: differential activation by BMAL1 and BMAL2 // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2003. Vol. 35, N 5. P. 473–481.
- Scott E. M., Carter A. M., Grant P. J. Association between polymorphisms in the *Clock* gene, obesity and the metabolic syndrome in man // *Int. J. Obes. (Lond.)* 2008. Vol. 32, N 4. P. 658–662.
- Somanath P. R., Podrez E. A., Chen J. et al. Deficiency in core circadian protein BMAL1 is associated with a prothrombotic and vascular phenotype // *J. Cell Physiol.* 2011. Vol. 226, N 1. P. 132–140.
- Storch K. F., Lipan O., Leykin I. et al. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart // *Nature.* 2002. Vol. 417, N 6884. P. 78–83.
- Takahashi J. S., Hong H. K., Ko C. H. et al. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease // *Nat. Rev. Genet.* 2008. Vol. 9, N 10. P. 764–775.
- Takeda N., Maemura K. Cardiovascular disease, chronopharmacotherapy, and the molecular clock // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010. Vol. 62, N 9–10. P. 956–966.
- Takeda N., Maemura K. Circadian clock and cardiovascular disease // *J. Cardiol.* 2011. Vol. 57, N 3. P. 249–256.
- Takeda N., Maemura K., Horie S. et al. Thrombomodulin is a clock-controlled gene in vascular endothelial cells // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, N 45. P. 32561–32567.
- Tsuzaki K., Kotani K., Sano Y. et al. The association of the *Clock* 3111 T/C SNP with lipids and lipoproteins including small dense low-density lipoprotein: results from the Mima study // *BMC Med. Genet.* 2010. Vol. 11, N 150.
- Ueberberg H., Laque K., Trieb G. Comparative studies on the circadian rhythm of corticosterone, lipid and cholesterol levels in adrenals and blood of rats // *Chronobiol. Int.* 1984. Vol. 1, N 1. P. 41–49.
- Undar L., Ertugrul C., Altunba H. et al. Circadian variations in natural coagulation inhibitors protein C, protein S and antithrombin in healthy men: a possible association with interleukin-6 // *Thromb. Haemost.* 1999. Vol. 81, N 4. P. 571–575.
- Van de Wouwer M., Collen D., Conway E. M. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004. Vol. 24, N 8. P. 1374–1383.
- Viswambharan H., Carvas J. M., Antic V. et al. Mutation of the circadian clock gene *Per2* alters vascular endothelial function // *Circulation.* 2007. Vol. 115, N 16. P. 2188–2195.

Voinescu B. I. Clock genes, chronotypes and diseases // HVM Bioflux. 2009. Vol. 1, N 1. P. 19–35.

Von Schantz M. Phenotypic effects of genetic variability in human clock genes on circadian and sleep parameters // J. Genet. 2008. Vol. 87, N 5. P. 513–519.

Wang F., Hu Z., Yang R. et al. A variant affecting miRNAs binding in the circadian gene *Neuronal PAS domain protein 2* (NPAS2) is not associated with breast cancer risk // Breast Cancer Res. Treat. 2011. Vol. 127, N 3. P. 769–775.

Wang N., Yang G., Jia Z. et al. Vascular PPAR controls circadian variation in blood pressure and heart rate through Bmal1 // Cell Metab. 2008. Vol. 8, N 6. P. 482–491.

Westgate E. J., Cheng Y., Reilly D. F. et al. Genetic components of the circadian clock regulate thrombogenesis in vivo // Circulation. 2008. Vol. 117, N 16. P. 2087–2095.

White W. B., Sica D. A., Calhoun D. et al. Preventing increases in early-morning blood pressure, heart rate, and the rate-pressure product with controlled onset extended release verapamil at bedtime versus enalapril, losartan, and placebo on arising // Am. Heart J. 2002. Vol. 144, N 4. P. 657–665.

Willich S. N., Linderer T., Wegscheider K. et al. Increased morning incidence of myocardial infarction in the ISAM Study: absence with prior beta-adrenergic blockade. ISAM Study Group // Circulation. 1989. Vol. 80, N 4. P. 853–858.

Woo K. C., Kim T. D., Lee K. H. et al. Mouse period 2 mRNA circadian oscillation is modulated by PTB-mediated rhythmic mRNA degradation // Nucleic Acids Res. 2009. Vol. 37, N 1. P. 26–37.

Woon P. Y., Kaisaki P. J., Braganca J. et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104, N 36. P. 14412–14417.

Yagita K., Tamanini F., van Der Horst G. T. et al. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts // Science. 2001. Vol. 292, N 5515. P. 278–281.

Yamashita T., Murakawa Y., Sezaki K. et al. Circadian variation of paroxysmal atrial brillation // Circulation. 1997. Vol. 96, N 5. P. 1537–1541.

Yamashita T., Sekiguchi A., Iwasaki Y. K. et al. Circadian variation of cardiac K⁺ channel gene expression // Circulation. 2003. Vol. 107, N 14. P. 1917–1922.

Young M. E. Anticipating anticipation: pursuing identification of cardiomyocyte circadian clock function // J. Appl. Physiol. 2009. Vol. 107, N 4. P. 1339–1347.

Young M. E. Circadian rhythms in cardiac gene expression // Curr. Hypertens. Rep. 2003. Vol. 5, N 6. P. 445–453.

Young M. E. The circadian clock within the heart: potential influence on myocardial gene expression, metabolism, and function // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2006. Vol. 290, N 1. P. 1–16.

Young M. E., Razeghi P., Cedars A. M. et al. Intrinsic diurnal variations in cardiac metabolism and contractile function // Circ. Res. 2001a. Vol. 89, N 12. P. 1199–1208.

Young M. E., Razeghi P., Taegtmeyer H. Clock genes in the heart: characterization and attenuation with hypertrophy // Circ. Res. 2001b. Vol. 88, N 11. P. 1142–1150.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Курбатова Ирина Валерьевна

младший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН,
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: irina7m@yandex.ru
тел.: (8142) 571879

Топчиева Людмила Владимировна

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН,
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: topchieva@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 571879

Немова Нина Николаевна

директор, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН,
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 783615

Kurbatova, Irina

Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences,
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: irina7m@yandex.ru
tel.: (8142) 571879

Topchieva, Lyudmila

Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences,
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: topchieva@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 571879

Nemova, Nina

Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences,
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nemova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 783615

УДК 577.1,574.24

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ ПО БИОХИМИЧЕСКОМУ СТАТУСУ

Н. Н. Немова, О. В. Мещерякова, Л. А. Лысенко, Н. Н. Фокина

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В статье обобщены результаты многолетних исследований влияния некоторых факторов среды (температура, соленость и аноксия, загрязнение водоема) на биохимический статус гидробионтов, обитающих в озерах Республики Карелия, сопредельных регионов и акватории Белого моря. Показана возможность применения различных биохимических параметров для оценки состояния рыб, моллюсков и изучения стратегии и механизмов их адаптаций в зависимости от природы воздействующего фактора или поллютанта. Рассмотрены особенности изменения активности ферментов и изоферментов энергетического и углеводного обменов, лизосомальных нуклеаз, цистеинзависимых внутриклеточных протеиназ (лизосомальных катепсинов и кальций-активируемых протеиназ цитозоля) липидного и жирнокислотного состава мембран в ответ на воздействие факторов среды.

К л ю ч е в ы е с л о в а: экологическая биохимия, рыбы, моллюски, ферменты, липиды, жирные кислоты, температура, соленость, аноксия, загрязнение, адаптация.

N. N. Nemova, O. V. Meshcheryakova, L. A. Lysenko, N. N. Fokina. THE ASSESSMENT OF THE FITNESS OF AQUATIC ORGANISMS RELYING ON THE BIOCHEMICAL STATUS

The paper summarizes the results of long-term research on the of influence of some environmental factors (temperature, salinity and anoxia, pollution) on the biochemical status of aquatic organisms that inhabit the lakes of the Republic of Karelia, adjacent areas, and the White Sea. The possibility of applying different biochemical parameters for assessing the status of fish, mollusks, as well as for studying their adaptation strategies and mechanisms depending on the nature of the influencing factor or pollutant is shown. The features of change in the activity of enzymes and isozymes of the energy and carbohydrate metabolism, lysosomal nucleases, cysteine-dependent intracellular lysosomal proteinases (lysosomal cathepsins and calcium-activated cytosol proteinases) in the lipid and fatty-acid composition of membranes in response to environmental impacts are considered.

K e y w o r d s: environmental biochemistry, fish, mollusks, enzymes, lipids, fatty acids, temperature, salinity, anoxia, pollution, adaptation.

Введение

Рациональное природопользование невозможно без проведения контроля за состояни-

ем природных сред [Израэль, 2009]. Водные организмы интегрируют неблагоприятные эффекты комплекса различных воздействий, имеют достаточно большие размеры и продолжи-

тельность жизни, обладают резистентностью к сублетальным воздействиям различных веществ и поэтому могут быть использованы для прогноза различного рода воздействий на водные экосистемы и здоровье человека [Лав, 1976; Шатуновский, 1980, 2007; Хлебович, 1981; Сидоров, 1983, 1989, 2000; Немова, 1996, 2005; Shulman, Love, 1999; Сидоров, Немова, 2000; Кашулин и др., 2003, 2008, 2009; Немова, Высоцкая, 2004; Смирнов, Богдан, 2007; Моисеенко, 2009; Мурзина и др., 2010; Алимов, Голубков, 2012].

Биохимические адаптации направлены на сохранение целостности и функциональной активности макромолекул (нуклеиновых кислот, ферментов, структурных и сократительных белков) и надмолекулярных комплексов (мембран, хромосом, рибосом), на обеспечение организма источниками энергии и питательными веществами, используемыми для биосинтеза белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов, составляющих ткани организма и являющихся запасами питательного материала; на поддержание регуляторных механизмов обмена веществ и его изменений в зависимости от непостоянных условий среды [Somero, 2011]. Каждое вещество может иметь свою специфическую «мишень» в метаболизме гидробионтов, что предполагает поиск важнейших и чувствительных биохимических тестов на различные воздействия. Биохимические методы позволяют наблюдать изменения в обмене веществ в организме, наступающие, как правило, до появления физиологических, морфологических и других отклонений от нормы, дают возможность выявить границы адаптационных способностей, определить фазу воздействия и на основании этого делать выводы о степени устойчивости и чувствительности видов [Немова, Высоцкая, 2004]. Такого рода исследования важны как для выяснения механизмов развития приспособительных реакций у рыб в ответ на воздействие разнообразных факторов среды, так и для прогноза возможных изменений ихтиофауны в водоеме.

Для оценки состояния водных организмов в лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН используют большой спектр биохимических методов, позволяющих оценить вариабельность примерно 100–150 индивидуальных показателей клеточного метаболизма рыб под влиянием различных, в том числе антропогенных, факторов среды обитания организмов. Эта система апробирована для оценки реакции рыб и беспозвоночных на воздействие различных факторов среды, в том числе токсич-

кологических [Сидоров, 1983, 2000; Сидоров, Немова, 2000; Мещерякова и др., 2004; Немова, Высоцкая, 2004; Немова, 2005; Бондарева и др., 2006; Смирнов, Богдан, 2007; Высоцкая, Немова, 2008; Немова и др., 2010, 2012; Фокина и др., 2010; Борвинская и др., 2013]. Основными объектами исследований были рыбы, относящиеся к различным семействам: Лососевые Salmonidae, Сиговые Coregonidae, Карповые Cyprinidae, Щуковые Esocidae, Окуневые Percidae, Тресковые Gadidae. Биохимический статус изучали также у некоторых видов моллюсков, десятиногих ракообразных – амфипод, гельминтов, паразитирующих на разных стадиях жизненного цикла рыб и насекомых. Отлов гидробионтов осуществляли в соответствии с целями эксперимента в озерах и реках Карелии, в акватории Белого моря, на базе карельских рыбозаводов, а также на озерах Кольского п-ова, Вологодской и Ярославской областей. Исследования проводили на разных стадиях онтогенеза рыб: использовали икру, личинок, молодь разных возрастов и половозрелых особей. Общепринятыми ихтиологическими методами определяли длину, массу, коэффициент упитанности рыб, пол, возраст, стадию зрелости гонад, степень зараженности гельминтами. Изучали влияние таких факторов, как температура, pH, соленость, аноксия, изменения в питании, действие промышленных отходов, в том числе различных органических и неорганических соединений, включая тяжелые металлы. В обзорной статье приведены некоторые примеры оценки состояния гидробионтов по биохимическому статусу при влиянии температуры, солености и гипоксии, антропогенных факторов.

Температура

Все стороны жизнедеятельности организма испытывают влияние множества биотических и абиотических факторов. Среди них температура окружающей среды является важнейшим экологическим фактором, оказывающим глубокое влияние на интенсивность большинства проявлений жизнедеятельности, как на отдельные физиологические и биохимические процессы, так и на поведенческие реакции на уровне организмов, популяций и сообществ [Озернюк, 1992, 2003, Somero, 2011; White, 2012]. Температура окружающей среды в значительной степени определяет интенсивность метаболических процессов в организме рыб как пойкилотермных животных, для которых ведущим параметром в поддержании гомеостаза является сохранение жизнедеятельности в ус-

ловиях низких температур. Температурные границы, в пределах которых тот или иной вид проявляет биологическую активность, определяются соответствующими адаптационными механизмами на различных уровнях – посттранскрипционном, молекулярном, биохимическом (метаболическом), клеточном, физиологическом и организменном [Somero, 2004, 2011, 2012; Pörtner, 2006; O'Brien, 2011; White et al., 2012]. На посттранскрипционном уровне температурные адаптации определяются уровнем экспрессии генов ряда белков, в т. ч. субъединиц ферментов и изоферментов [Zakhartsev et al., 2007; Orczewska et al., 2010; Meshcheryakova et al., 2012]. На молекулярном уровне температурные адаптации определяются такими показателями, как свойства внутриклеточной воды, денатурация белков, изменение скорости диффузии кислорода [Somero, 2010]. На биохимическом уровне температурные адаптации осуществляются через модуляцию скорости ферментативных реакций, равновесие тех или иных метаболических процессов, изменение липидного состава мембран [Крепс, 1981; Guderley, 2004; Somero, 2004, 2011, 2012; Kraffe et al., 2007; Dong, Somero, 2009; White, 2012] и др. На клеточном уровне температурные адаптации сопровождаются изменением структуры и функций клеточных органелл, например – количества митохондрий и их структуры [Lucassen et al., 2003; Kraffe et al., 2007; O'Brien, 2011].

Формирование температурных адаптаций рыб имеет ряд специфических особенностей, при этом результаты свидетельствуют о единой биохимической основе модификации обменных процессов у холоднокровных и теплокровных организмов. Вопрос о температурных адаптациях рыб теснейшим образом связан с сезонными колебаниями метаболизма; для пойкилотермных животных именно температура является ведущим фактором, определяющим ритмичность биологических процессов [Шмид-Ниельсен, 1982; Новиков, 2000; Озернюк, 2000]. В течение года температура водоема значительно изменяется. Так, в озерах Карелии температура воды с декабря до конца апреля составляет всего 1,0–1,5 °С. В мае наблюдается резкий скачок – вода прогревается до 20 °С. Начиная с августа происходит постепенное снижение температуры. Эти колебания температуры сказываются и на состоянии кормовой базы рыб, и на их пищевой активности, а следовательно, и на особенностях обмена веществ: происходит изменение скорости и направления реакций метаболизма.

Развитие температурных адаптивных реакций имеет физиологические ограничения, превышение которых приводит к необратимым деструктивным процессам в фосфолипидном матриксе печени и мышц и биоэнергетической дисфункции тканей, что коррелирует с низкой выживаемостью рыб. Несмотря на изменение температуры окружающей среды, основные метаболические функции должны поддерживаться на постоянном уровне, который может колебаться только в определенных пределах. Еще раз следует подчеркнуть, что у многих пойкилотермных организмов хорошо развиты компенсаторные механизмы изменения стандартного метаболизма, сезонная акклимация. Например, уровень макроэргических фосфорных соединений может колебаться в значительных пределах и определяться рядом факторов, в том числе сезоном года. Интенсивность многих катаболических реакций при акклимации к холоду возрастает. Наибольшую степень компенсации температурных эффектов обнаруживают те ферментативные реакции, которые участвуют в генерировании «энергетической валюты» клетки, необходимой в любое время года [Озернюк, 2000; Guderley, 2004; O'Brien, 2011; Somero, 2011, 2012]. Наши исследования показали, что у холодноводной радужной форели и обитающего в теплых водах карпа механизмы адаптации к температуре одинаковы [Немова, Высоцкая, 2004]. Однако существует тканевая специфичность адаптивных перестроек и асинхронность в подключении разных ферментов в реакции, что подтверждено результатами наших исследований по участию лизосом в биохимической адаптации организма рыбы к меняющейся температуре среды. Установлено, что при тепловой акклимации у радужной форели в мышцах наблюдалось изменение седиментационных характеристик лизосом, увеличивалась общая активность ферментов-маркеров этих органелл – кислой фосфатазы, лизосомальных протеиназ – катепсинов Б и Д [Высоцкая, Немова, 2008], которые включаются на определенном этапе адаптивных перестроек в механизмы регуляции ферментативных реакций.

Адаптивные преобразования в клетке осуществляются как за счет количественных изменений содержания ферментов, так и за счет регуляции качественного состава их изоформ. Присутствие в клетке изоферментов, различающихся по своим кинетическим свойствам, – один из механизмов быстрой регуляции ответной реакции на изменение температуры. Большое разнообразие изоферментов

наблюдается у рыб, что связано прежде всего с различными условиями их существования и принадлежностью к группе эктотермных животных. Компенсация влияния температуры сводится в первую очередь к изменению эффективности функционирования ферментов [Озернюк, 1992, 2003; Somero, 2011], и одним из таких механизмов является изменение сродства фермента к субстрату. Например, изоферменты лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) осуществляют взаимопревращения лактата и пирувата, участвуя в регуляции направления и интенсивности, путей аэробного и анаэробного синтеза АТФ. Все изоферменты ЛДГ при одной и той же температуре различаются по величине константы Михаэлиса-Ментен (K_m) для лактата, и исходя из этой величины можно судить о степени фермент-субстратного сродства и направлении катализируемой ими реакции. На примере леща *Abramis brama* L. в наших исследованиях [Meshcheryakova et al., 2012] было показано, что при понижении температуры наблюдается уменьшение величины K_m всех изоферментов ЛДГ сердечной мышцы леща, то есть увеличение фермент-субстратного сродства, позволяющее повысить эффективность функционирования фермента при низкой температуре. При высокой температуре наблюдается обратный эффект – снижение фермент-субстратного сродства изоферментов, позволяющее понизить активность фермента при данной температуре. Изменения кинетических характеристик фермент-субстратного сродства и максимальной скорости реакции при различных температурах свидетельствуют о настройке биохимических свойств изоферментов ЛДГ на определенный уровень, направление и интенсивность метаболизма лактата и пирувата. Это хорошо согласуется с известными представлениями об изменении уровня аэробно-анаэробного метаболизма у рыб при изменении температуры водоема и содержания растворенного кислорода. Обнаружены компенсаторные изменения кинетических свойств K_m для лактата и максимальной скорости реакции (V_{max}) в реакции лактат→пируват для цитоплазматических и митохондриальных изоферментов лактатдегидрогеназы радужной форели *Parasalmo mykiss* L. При повышении и понижении температуры воды [Meshcheryakova et al., 2012].

Результаты проведенных нами многочисленных исследований биохимического статуса водных организмов при изменении температуры свидетельствуют о важной роли липидов и белков в становлении биохимических адапта-

ций у животных. Для животных, вне зависимости от физиологической организации – холонокровные или теплокровные, эволюционно характерен общий план строения липидной компоненты клеток [Крепс, 1981]. Изменение регуляции липидного обмена рыб при низких температурах обуславливает модификацию структурной организации клеток в основном за счет уменьшения содержания фосфолипидов и связанных с ними полиненасыщенных жирных кислот, преимущественно докозагексановой [Смирнов, Богдан, 2007]. При этом развитие адаптивных реакций к гипотермии имеет физиологические ограничения, превышение которых приводит к необратимым деструктивным процессам в фосфолипидном матриксе и биоэнергетической дисфункции тканей, что коррелирует с низкой выживаемостью рыб. Обнаружено, что жирнокислотный состав половых продуктов рыб соответствует не реальным температурным условиям, окружающим рыбу в данный момент, а термическому диапазону размножения, т. е. преадаптирован к нему эволюционно [Смирнов, Богдан, 2007].

Исследования изменений параметров теплоустойчивости интактных эритроцитов, а также термоиндуцированных структурных переходов белков мембраны и цитоскелета красных клеток крови и денатурация гемоглобинов при сезонных акклиматизациях форели свидетельствуют о том, что терморезистентность эритроцитов претерпевает выраженные сезонные изменения, согласующиеся с изменениями температуры воды [Горюнов и др., 1999; Рипатти, Рабинович, 1999]. При низких температурах воды отмечено повышение содержания насыщенных и моноеновых жирных кислот, сопровождающееся уменьшением терморезистентности эритроцитов. В летние месяцы в мембранах выявлена более высокая доля полиненасыщенных жирных кислот, что коррелировало с возрастанием теплоустойчивости клеток. По-видимому, инициация термогемолиза эритроцитов связана не столько с тепловыми превращениями белков, сколько с реорганизацией в системе «белковый каркас – фосфолипиды», поскольку аннулярный слой интегральных белков обогащен липидами с полиненасыщенными жирнокислотными цепями. Предполагается, что структурной предпосылкой обнаруженных взаимосвязей является также упаковка жирнокислотных цепей, которая определяет структурную прочность бислоя и лежит в основе как устойчивости мембраны в целом, так и функциональной способности извлечения кислорода эритроцитами [Рабинович и др., 2007].

Соленость и аноксия

Мидии *Mytilus edulis* L., как большинство обитателей приливно-отливной (литоральной) территории моря, способны существовать при значительных изменениях солености. Являясь осмоконформерами (т. е. пойкилосмотическими организмами), эти моллюски не способны регулировать осмотическую концентрацию полостной жидкости и поддерживают состояние, близкое к изотонии, в широком диапазоне солености внешней среды [Бергер, 1986]. Кроме того, мидии являются типичными факультативными анаэробами, способными существовать как в нормальных (кислородных), так и в аноксийных условиях [Larade, Storey, 2002; Алякринская, 2004]. Таким образом, этот моллюск может использоваться для изучения влияния таких основных абиотических факторов среды обитания, как соленость и аноксия. В связи с этим было изучено влияние различной солености и краткосрочной аноксии на биохимический статус мидий *Mytilus edulis* L., собранных в губе Чупа Кандалакшского залива Белого моря. Исследования были проведены на моллюсках, обитающих в различных условиях, а именно – в прибрежной зоне моря (на литорали), периодически подвергающейся воздействию приливно-отливных циклов, и на искусственных субстратах марикультуры, для которых не характерны частые перепады факторов среды. Аквариальные эксперименты были поставлены на Беломорской биологической станции «Картеш» Зоологического института РАН. Мидии содержались в аквариумах в течение 14 сут. при температуре +10 °С с соленостью воды 5, 15, 25, 35 и 45 ‰ при постоянной продувке и частичной смене воды. В природных условиях соленость морской воды в Белом море составляет 25 ‰, поэтому данная концентрация солей была принята за контроль. При постановке экспериментов учитывалась стадия репродуктивного цикла моллюсков, в частности этап нереста (стадия 3 гаметогенеза): 3В (вымет гамет, конец июня) и 3С (резорбция остаточных половых продуктов, конец июля – начало августа). Для создания аноксийных условий обитания литоральные и сублиторальные мидии содержались на воздухе в течение 24 ч., контрольные мидии находились в аквариуме (в аэрируемой воде).

У мидий изучали содержание белка, состав липидов (общие липиды, фосфолипиды, триацилглицерины, холестерин и его эфиры, жирные кислоты), активность ферментов энергетического обмена (ЛДГ, МДГ, ГФДГ, альдолазы, ЦО), активность гидролитических ферментов

лизосом (ДНКазы, РНКазы, β-глюкозидазы, кислой фосфатазы, катепсина В, катепсина D), активность кальцийактивируемых протеиназ цитозоля и их специфического эндогенного ингибитора кальпастина. Воздействие различной солености морской воды и влияние краткосрочной аноксии на литоральных и сублиторальных мидий отразилось на содержании холестерина (ХС), коэффициента Дьердии (холестерин/фосфолипиды, ХС/ФЛ) и соотношении доминирующих фосфолипидов мембран фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин (ФХ/ФЭА). Модификации в составе данных мембранных компонентов были отмечены в различных органах-мишенях и зависели от стадии нереста моллюсков, а также от степени влияния факторов (в частности, критические или умеренные значения солености) [Фокина и др., 2007, 2010, 2011; Nemova et al., 2013]. Известно, что колебания в соотношениях ХС/ФЛ и ФХ/ФЭА являются одним из параметров состояния вязкости биологических мембран и, как следствие, изменения ионной проницаемости и активности встроенных в мембрану белков [Крепс, 1981; Gillis, Ballantyne, 1999; Смирнов, Богдан, 2007]. В связи с этим отмеченные колебания данных мембранных липидов, а также повышенное содержание фосфатидилсерина у мидий при влиянии различной солености и краткосрочной аноксии указывают на модификацию активности ферментов, ионных каналов и насосов, а также осмо- и натриорецепторов, встроенных в мембраны жабр и мантийной ткани и ответственных за регуляцию клеточного объема и протекания большинства метаболических процессов [Бергер, 1986]. Более того, изменения концентрации фосфатидилинозитола и сфингомиелина, которые служат предшественниками для образования вторичных мессенджеров, осуществляющих контроль над многими клеточными функциями, такими как дифференциация, пролиферация, метаболизм и апоптоз [Ткачук, 1998; Цюпко и др., 2001; Di Paolo De Camilli, 2006], свидетельствуют об участии различных сигнальных метаболических путей в процессе акклимации моллюсков к указанным абиотическим факторам среды. Характерной особенностью ответной реакции литоральных мидий на действие различной солености и краткосрочной аноксии служила обратная корреляция в содержании неметиленразделенных жирных кислот (НМРЖК) и полиеновых кислот n-3 семейства. В частности, недостаток n-3 ПНЖК у прибрежных мидий компенсировался повышенными концентрациями НМРЖК, которые содержат изолированные двойные связи при нечетных атомах углерода и благодаря этому имеют низ-

кую скорость автоокисления. Этот эффект делает мембраны устойчивыми к окислению, тогда как необходимый уровень мембранной жидкости сохраняется. Колебания в содержании триацилглицеринов указывают на использование их в качестве источников метаболической энергии, необходимой для процессов акклимации литоральных и сублиторальных мидий к исследуемым абиотическим факторам, причем они отражают энергетические потребности моллюсков в зависимости от стадии их нереста.

Изменение активности лизосомальных нуклеаз, цистеинзависимых внутриклеточных протеиназ (лизосомального катепсина В и кальцийактивируемых протеиназ цитозоля), ферментов углеводного обмена в тканях мидий при изменении солёности среды свидетельствует об участии этих ферментов в адаптивном ответе клетки [Высоцкая и др., 2009; Канцорова и др., 2009]. Адаптация мидий к опреснённой воде сопровождается увеличением активности ферментов, участвующих в аэробных метаболических процессах, что, вероятно, обусловлено необходимостью усиления синтеза АТФ для обеспечения процессов осморегуляции. Изменения в активности ферментов, наблюдаемые у сублиторальных мидий, свидетельствуют об активизации анаэробного гликолиза и пентозофосфатного пути [Васильева, Мещерякова, 2003]. Выявлено снижение активности большинства лизосомальных ферментов в тканях мидий даже при небольших изменениях солёности, что вполне согласуется с характерной для этих животных способностью снижать интенсивность метаболизма в десятки раз в ответ на воздействие неблагоприятных факторов среды. Прямым доказательством использования такого механизма адаптации в данном случае являются результаты, свидетельствующие о нарушении биосинтеза коллагена, и данные об активности коллагеназы. Так, у литоральных и сублиторальных мидий снижается активность коллагеназы в два раза как при увеличении, так и при снижении количества соли в среде их содержания. Значение солёности 5 ‰, вероятно, превышает адаптивный порог мидий и вызывает негативные перестройки в тканях. Мидии литоральной зоны более адаптированы к возможному анаэробизму, чем сублиторальные, о чем свидетельствуют данные по изменению параметров липидного и энергетического обмена [Васильева, Мещерякова, 2003]. Преадаптированность литоральной группы мидий к обитанию в прибрежной зоне с неустойчивым температурным, солёностным и кислородным режимом выражается в повышенной устойчивости к гипоксии и факультативному анаэробизму, сопровождающих ответную реакцию на резкие колебания факторов среды. Показано, что значительное опреснение среды угрожает стабильности обменных процессов на клеточном уровне, а следовательно, и благополучию организма в целом, в большей степени, чем повышенная солёность. При этом адаптивные возможности клеточного метаболизма снижаются и возможны патологические изменения в организме, связанные с нарушением процессов осморегуляции.

тивному анаэробизму, сопровождающих ответную реакцию на резкие колебания факторов среды. Показано, что значительное опреснение среды угрожает стабильности обменных процессов на клеточном уровне, а следовательно, и благополучию организма в целом, в большей степени, чем повышенная солёность. При этом адаптивные возможности клеточного метаболизма снижаются и возможны патологические изменения в организме, связанные с нарушением процессов осморегуляции.

Антропогенные факторы

В нашей лаборатории проведены многочисленные исследования влияния острых и хронических воздействий поллютантов различной природы на биохимический статус гидробионтов, обитающих в природных водоемах и в условиях аквариальных экспериментов. Изучали воздействие стоков горно-обогатительного производства, металлургических предприятий, комплексного загрязнения Белого моря, в том числе тяжелыми металлами и компонентами нефти [Bakhmet et al., 2012; Канцорова и др., 2012; Fokina et al., 2013]. Исследования проводили на водоемах Северо-Запада России (озерах Республики Карелия, Вологодской области, Кольского п-ова, в Белом море), характеризующихся разной степенью загрязнения бытовыми и промышленными стоками, включающими тяжелые металлы (ртуть, стронций, кадмий, медь, никель), нефтепродукты, компоненты буровых растворов, мелкодисперсную взвесь и др.

Показано, что устойчивость и чувствительность исследованных видов гидробионтов к воздействию различного рода токсических веществ зависит как от степени функционирования ферментов биотрансформации ксенобиотиков, так и от состояния других биохимических систем клетки (лизосомы, мембраны, регуляторные ферменты), участвующих в реализации защитных реакций организма, в развитии «ответа» клетки на уровне биохимических изменений [Немова, Высоцкая, 2004; Нефедова и др., 2007; Высоцкая, Немова, 2008; Биота..., 2012]. Так, например, установлена видоспецифичная реакция у плотвы, щуки и сига к минеральному загрязнению в озере Костомукшском, испытывающем воздействие стоков Костомукшского ГОК [Борвинская и др., 2011а, б; Крупнова и др., 20011; Чурова и др., 2011; Немова и др., 2012; Биота..., 2012; Вдовиченко, Высоцкая, 2013]. Показано, что окунь адаптирован к жизни в кислых гумифицированных озерах [Мещерякова и др., 2004; Немова, 2005; Вы-

соцкая, Немова, 2008] и не встречается в водоемах, характеризующихся высоким содержанием калия и щелочной реакцией среды. Значительные адаптационные возможности обнаружены у щуки в водоемах Мурманской области, подвергающихся действию промышленных стоков, содержащих такие тяжелые металлы, как стронций, никель и медь [Морозов и др., 2007]. Ряпушка оказалась весьма пластичным видом, который может приспосабливаться к техногенным загрязнениям, но проявляет высокую чувствительность к биотическим воздействиям [Высоцкая и др., 2006; Морозов и др., 2006, 2007]. Установлено, что комплексное загрязнение, включающее вещества органической и неорганической природы и механические взвеси, индуцирует неспецифические ответные реакции, при «умеренном» действии имеющие компенсаторный характер, а при превышении определенного порога чувствительности вызывает тканевую патологию.

Для тестирования состояния рыб при токсических воздействиях предложен «биохимический интегральный индекс» (БИИ), как важный показатель при определении предельно-допустимых концентраций токсикантов. БИИ – число показателей, близких к крайним границам их естественной вариабельности или выходящих за ее пределы, то есть уже патологичных, выраженное в % к общему числу изученных признаков (минимум 30–35) [Немова, Высоцкая, 2004].

Ответная реакция метаболизма зависит от концентрации поллютанта, его природы, времени воздействия, что определяет специфичность его действия, динамику аккумуляции и перераспределения в организме. Например, при оценке эффектов накопления ртути в рыбах использовали широкий спектр ферментов (кислая фосфатаза, РНКаза, ДНКаза, β -глюкозидазы, β -галактозидазы, катепсины В и D, щелочная фосфатаза, альдолаза, кальпаины), липидов, пептидов, позволяющих проследить изменения ключевых обменных процессов в тканях рыб (печени, жабрах, мышцах и гонадах) [Мещерякова и др., 2004; Немова, 2005; Кяйвярайнен и др., 2009]. Было показано, что ответная реакция организма на накопление ртути зависит не только от концентрации ее в органах и тканях, но и от таких сопутствующих факторов, как pH и гумифицированность водоема.

Заключение

Таким образом, результаты исследований состояния водных организмов (рыб и беспозвоночных) на основании биохимического

статуса свидетельствуют о разнообразных и разнонаправленных изменениях в обмене основных компонентов клетки и регуляторов метаболизма и дают основания сделать ряд выводов и заключений.

Ответная реакция организма реализуется за счет изменения основных метаболических путей: *обмена запасных и мембранных липидов*, включая те, что отвечают за поддержание функционального статуса и регуляторные свойства биологических мембран, прежде всего жирных кислот, холестерина, фосфолипидов и их отдельных фракций; *белкового метаболизма*, о чем свидетельствует модуляция активности ферментов внутриклеточного протеолиза и соотношения молекулярных форм протеиназ, благодаря которым изменяется содержание их белковых субстратов и фракционный состав образующихся пептидов с различным молекулярным весом, а также *энергопродукции* – синтеза важнейшей энергетической валюты клетки АТФ, интенсивность которого определяется активностью ферментов энергетического метаболизма. Несомненно, энергетический обмен может рассматриваться как связующее звено всех вышеперечисленных метаболических путей.

Реакция метаболических процессов у водных организмов на изменение исследуемых природных и антропогенных факторов различается в зависимости от таксономической и половой принадлежности организма, его физиологического состояния, стадии развития, природы и силы воздействующего фактора. Наряду с общими, выработанными в ходе эволюции механизмами биохимических адаптаций, которые позволяют водным организмам в условиях изменения факторов среды поддерживать гомеостаз с минимальными потерями, имеются и некоторые специфические особенности адаптивного ответа на уровне метаболизма. Они определяются их принадлежностью к эктотермным организмам, возрастом, стадией жизненного цикла, особенностями экологии и т. д. Особенности адаптаций у водных организмов связаны прежде всего с полной зависимостью от среды и принадлежностью к группе эктотермных животных, а также с особенностями цикла развития. Для них показана некая «растянутость» (во времени) адаптивных перестроек по сравнению с теплокровными, характерен более широкий набор изоферментов, большая степень ненасыщенности жирных кислот. Соотношение структурных липидов и жирных кислот в мембранах соответствует физическим или химическим особенностям среды. Биохимические адаптации у обитателей

северных водоемов (стенобионтных организмов), развитие и становление которых происходит при сравнительно низкой температуре, слабой минерализации, олиготрофности, более разнообразны.

Биохимические адаптации к изменению факторов среды на уровне клеточного метаболизма обычно носят компенсаторный характер, за исключением экстремальных случаев. Изменяется интенсивность метаболизма и соотношение между отдельными его путями. Модуляции активности ферментов (функциональная активность, сродство фермента субстрату, изоферментный состав и т. д.), уже функционирующих в клетке, создают возможность быстрой адаптации. Большое значение имеют адаптации на уровне микросреды, прежде всего липидного окружения, в котором функционируют мембраносвязанные ферменты. Адаптивные изменения липидных систем во многом сходны с адаптивными изменениями белков. В обоих случаях для обратимых перестроек необходима «полустабильность» структуры. Приспособительные изменения структуры крупных молекул – белков, липидов и нуклеиновых кислот – дополняются адаптивными сдвигами той микросреды, в которой эти молекулы функционируют.

Долговременные эволюционные изменения часто сходны с кратковременными акклиматизационными сдвигами. В этом отношении показательны адаптивные изменения липидов: поддержание нужной микровязкости достигается сравнимыми способами как у видов, приспособленных к разным температурам, так и у популяции одного и того же вида, акклиматизированных к разным условиям.

Следует особо подчеркнуть, что при анализе материалов, полученных при исследовании влияния факторов среды на состояние водных организмов, необходимо использовать комплексный подход. Методология изучения эколого-биохимического состояния водных организмов, позволяющая делать выводы о состоянии водных экосистем, включает в себя использование различных биохимических методов оценки состояния клеточного метаболизма рыб и водных беспозвоночных, а также методы ихтиологических наблюдений и статистического анализа. Такой подход включает в себя учет тех принципов, которые предложены и неоднократно апробированы в наших исследованиях. Комплексная биохимическая система может быть использована для выявления различных отклонений физиологического состояния рыб, возникающих под влиянием разнообразных экологических факторов, в том числе имеющих и антропогенный характер. Результаты таких

исследований важны как для выяснения механизмов развития приспособительных реакций у живых организмов, стоящих на различных ступенях эволюционного развития, в ответ на воздействие разнообразных факторов среды, так и для разработки критериев оценки стабильности водных экосистем и прогнозирования их возможных изменений.

Следует отметить, что природа адаптивных изменений высококонсервативна ввиду необходимости сохранения биохимического единства перед лицом разнообразия адаптивных задач. Для достижения этой консервативной цели требуются не только соответствующие генные продукты, например ферменты с характеристиками, подходящими для их термальной ниши, но также и генные регуляторные механизмы, которые обеспечат соответствующие типы генов, вызывающих адаптивные изменения [Somero, 2011, 2012]. Имеющиеся в организме механизмы всех видов адаптаций, направленные на выживание особи, находятся в сложном взаимодействии, а сам организм является целью и средством продления жизни [Хочачка, Сомеро, 1980; Hochachka, Somero, 2002; Somero, 2011, 2012].

Исследования выполнялись с использованием приборной базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН и поддержаны грантами: Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4, НШ-1642.2012.4 и НШ-1410.2014.4; РФФИ 14-04-00473-а; Программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие» 2009–2011 гг. и «Живая природа» 2012–2014 гг., а также Программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биоресурсы» 2009–2011 гг. и 2012–2014 гг.; Проектов ФЦП «Кадры» (г. к. № 02.740.11.0700 и согл. № 8050).

Литература

- Алимов А. Ф., Голубков С. М. (ред.) Динамика биологического разнообразия и биоресурсов континентальных водоемов. СПб.: Наука, 2012. 369 с.
- Алякринская И. О. Устойчивость к обсыханию водных моллюсков // Известия РАН. Серия биологическая. 2004. № 3. С. 362–374.
- Бергер В. Я. Адаптации морских моллюсков к изменениям солености среды. Л.: Наука, 1986. 214 с.
- Биота северных озер в условиях антропогенного воздействия (ихтиологические, паразитологические и биохимические аспекты) / Кол. моногр. под общ. ред. Н. Н. Немовой. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2012. 228 с.
- Бондарева Л. А., Немова Н. Н., Кяйвяряйнен Е. И. Внутриклеточная Ca^{2+} -зависимая протеолитическая система животных. М.: Наука, 2006. 294 с.

Борвинская Е. В., Смирнов Л. П., Суховская И. В., Немова Н. Н. Влияние минерализации на активность глутатион S-трансферазы у некоторых видов пресноводных рыб северных водоемов // Труды КарНЦ РАН. 2011а. № 3. С. 16–28.

Борвинская Е. В., Немова Н. Н., Смирнов Л. П. Глутатион-S-трансфераза у рыб северных водоемов: влияние минерализации водной среды // Доклады Академии наук. Серия Биология. 2011б. Т. 436, № 4. С. 566–568.

Борвинская Е. В., Немова Н. Н., Смирнов Л. П. Глутатион S-трансфераза из печени щуки: выделение и свойства // Доклады Академии наук. Серия Биология. 2013. Т. 448, № 2. С. 236–238.

Васильева О. Б., Мещерякова О. В. Некоторые особенности липидного и углеводного обменов мидий *Mytilus edulis* Белого моря в условиях краткосрочной гипоксии // Материалы докладов Десятой молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии», 15–17 апреля 2003 г. 2003. С. 45–47.

Вдовиченко Е. А., Высоцкая Р. У. Сравнительная характеристика активности лизосомальных гликозидаз у щук, обитающих в водоемах с разным уровнем антропогенной нагрузки // Фундаментальные исследования. 2013. № 4 (часть 5). С. 1134–1138.

Высоцкая Р. У., Каймина Н. В., Сидоров В. С. Влияние различных солей калия на активность некоторых ферментов развивающейся икры радужной форели // Гидробиол. журн. 2000. Т. 36, № 6. С. 82–91.

Высоцкая Р. У., Немова Н. Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. М.: Наука, 2008. 284 с.

Высоцкая Р. У., Амелина В. С., Бахмет И. Н. Влияние нефтепродуктов на активность лизосомальных ферментов мидий в аквариальных экспериментах // Материалы XXVIII междунар. конф. «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера». Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. С. 123–126.

Высоцкая Р. У., Такшеев С. А., Немова Н. Н., Амелина В. С., Морозов Д. Н. О видоспецифичности биохимических реакций рыб на разные типы антропогенного воздействия // Северная Европа в XXI веке: природа, культура, экономика: материалы междунар. конф., посвященной 60-летию КарНЦ РАН (24–27 октября 2006 г.). Секция «Биологические науки». Секция «Науки о Земле». Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2006. С. 75–77.

Горюнов А. С., Борисова А. Г., Суханова Г. А. Соотношение параметров терморезистентности и структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов и гемоглобинов // II Съезд биофизиков России: тезисы докладов. Москва, 23–27 августа 1999 г. 1999. С. 485–486.

Израэль Ю. А. Проблемы антропогенной экологии // Научные аспекты экологических проблем России. М.: Наука, 2009. Т. 1. 221 с.

Канцерова Н. П., Лысенко Л. А., Немова Н. Н., Осташкова В. В. Влияние ионов тяжелых металлов на внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы *Mytilus edulis* L. в экспериментах *in vitro* и *in vivo* // Материалы XXVIII междунар. конф. «Биологические

ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера». 5–8 окт. 2009 г. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. С. 257–261.

Канцерова Н. П., Фокина Н. Н., Лысенко Л. А., Немова Н. Н. Взаимосвязь активности Ca^{2+} -зависимых протеиназ с содержанием липидных компонентов мембран в органах мидии *Mytilus edulis* при накоплении тяжелых металлов // Биоорганическая химия. 2012. Т. 38, № 1. С. 86–91.

Кашулин Н. А., Лукин А. А., Амундсен П. А. Рыбы пресных вод Субарктики как биоиндикаторы техногенного загрязнения. Апатиты: КНЦ РАН, 1999. 142 с.

Кашулин Н. А., Денисов Д. Б., Сандимиров С. С., Даувальтер В. А., Кашулина Т. Г., Малиновский Д. Н., Вандыш О. И., Ильишук Б. П., Кудрявцева Л. П. Антропогенные изменения водных систем Хибинского горного массива (Мурманская область). Апатиты, 2008. Т. 1. 244 с.

Кашулин Н. А., Петров В. Н., Певзнер С. Л. Об оценке биологических ресурсов Мурманской области // Кольский полуостров на пороге третьего тысячелетия: экологические проблемы. Апатиты, 2003. С. 23–36.

Кашулин Н. А., Сандимиров С. С., Даувальтер В. А., Терентьев П. М., Денисов Д. Б. Экологический каталог озер Мурманской области. Апатиты, 2009. Ч. 1. 226 с.

Комаровский Ф. Я., Полищук Л. Р. Ртуть и другие тяжелые металлы в водной среде: миграции, накопление, токсичность для гидробионтов (обзор) // Гидробиологический журнал. 1981. Т. 17, № 5. С. 71–82.

Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адапционная функция липидов. СПб.: Наука, 1981. 339 с.

Крупнова М. Ю., Ильмаст Н. В., Немова Н. Н. Активность лизосомальных протеиназ в органах щук (*Esox lucius* L.), отловленных из озер с различной антропогенной нагрузкой // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспер. биология. 2011. № 3. С. 69–72.

Кяйвяряйнен Е. И., Борвинская Е. В., Немова Н. Н., Комов В. Т. Влияние аккумуляции ртути на активность Ca^{2+} -активируемых протеиназ в тканях окуней (*Perca fluviatilis*) из озер вблизи биостанции Картеш (Белое море) // Материалы XXVIII междунар. конф. 5–8 окт. 2009 г. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. С. 324–329.

Лав М. Химическая биология рыб. М., 1976. 349 с.

Мещерякова О. В., Груздев А. И., Немова Н. Н. Сравнительная оценка углеводного обмена окуней (*Perca fluviatilis* L.) из водоемов с различным уровнем содержания гуминовых кислот // Известия РАН. Серия биологическая, № 1, 2004. С. 21–26.

Моисеенко Т. И. Водная экотоксикология. М.: Наука, 2009. 400 с.

Морозов Д. Н., Высоцкая Р. У., Ряжки И. В. Изучение гидроксилазной активности цитохрома P-450 у ряпушки *Coregonus albula* L. при загрязнении промышленными отходами горно-обогатительного комбината // Материалы междунар. конф. «Северная Европа в XXI веке: природа, культура, экономика. Секция «Биологические науки». Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2006. С. 151–153.

Морозов Д. Н., Высоцкая Р. У., Немова Н. Н., Кашулин Н. А. Активность цитохрома Р-450 у сига *Coregonus lavaretus* и щуки *Esox lucius* из водоемов Субарктики при воздействии сточных вод горно-перерабатывающих предприятий // Вопросы ихтиологии. 2007. Т. 47, № 1. С. 101–106.

Морозов Д. Н., Высоцкая Р. У. Сравнительное изучение желчно-кислотного состава желчи европейской ряпушки *Coregonus albula* и сига *Coregonus lavaretus* в условиях техногенного загрязнения водоема // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2007. Т. 43, № 5. С. 410–413.

Мурзина С. А., Немова Н. Н., Нефедова З. А., Фальк-Петерсен С. Влияние экологических условий обитания люмпена пятнистого *Leptoclinus maculatus* на липидный состав печени и мышц // Экология. 2010. Т. 41, № 1. С. 51–54.

Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 215 с.

Немова Н. Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. М.: Наука, 2005. 165 с.

Немова Н. Н., Иешко Е. П., Мещерякова О. В., Ильмаст Н. В., Аникиева Л. В., Лебедева Д. И., Чурова М. В., Стерлигова О. П., Кучко Я. А. Сиг *Coregonus lavaretus* (L.) костомукшского хвостохранилища в условиях техногенного загрязнения // Экология. 2012. № 4. С. 1–6.

Немова Н. Н., Лысенко Л. А., Канцерова Н. П. Протеиназы семейства кальпаинов. Структура и функции // Онтогенез. 2010. Т. 41, № 5. С. 381–389.

Немова Н. Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1996. 121 с.

Нефедова З. А., Руоколайнен Т. Р., Васильева О. Б., Немова Н. Н., Шарова Н. П. Особенности состава тканевых липидов сегов (*Coregonus lavaretus* L.), обитающих в водоемах с разной антропогенной нагрузкой // Вопросы ихтиологии. 2007. Т. 47, № 1. С. 107–112.

Новиков Г. Г. Рост и энергетика развития костистых рыб в раннем онтогенезе. М.: Эдиториал УРСС, 2000. 296 с.

Озернюк Н. Д. Биоэнергетика онтогенеза. 2000. М.: Изд-во МГУ. 259 с.

Озернюк Н. Д. Механизмы адаптаций. М.: Наука, 1992. 272 с.

Озернюк Н. Д. Феноменология и механизмы адаптационных процессов. М.: Изд-во МГУ. 2003. 215 с.

Рабинович А. Л., Корнилов В. В., Балабаев Н. К., Леермакерс Ф. А. М., Филиппов Ф. В. Свойства бислов ненасыщенных фосфолипидов: влияние холестерина // Биологические мембраны. 2007. Т. 24, вып. 6. С. 490–505.

Рипатти П. О., Феклов Ю. А., Руоколайнен Т. Р., Маркова Л. В. и др. Липиды печени и мышц камбалы *Platichthys flesus* L. при воздействии компонентов буровых растворов в аквариальных опытах // Современные проблемы физиологии и экологии морских животных: сб. науч. трудов. Апатиты: ММБИ КНЦ РАН, 2003. С. 157–168.

Рипатти П. О., Рабинович А. Л. Изучение температурной зависимости характеристик липидных молекул: имитационное моделирование (метод Монте-Карло) // II Съезд биофизиков России. 23–27 августа 1999 г. Москва. Тезисы докладов. 1999. С. 554–555.

Сидоров В. С., Немова Н. Н., Высоцкая Р. У., Феклов Ю. А. Использование интегрального биохимического индекса при определении предельно допустимых концентраций промышленных токсикантов // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т. 38, № 3. С. 345–350.

Сидоров В. С. Экологическая биохимия рыб. Липиды. Л.: Наука, 1983. 240 с.

Сидоров В. С., Высоцкая Р. У., Смирнов Л. П., Гурьянова С. Д. Сравнительная биохимия гельминтов рыб // Аминокислоты, белки, липиды. Л.: Наука, 1989. 152 с.

Сидоров В. С., Немова Н. Н. Принципы и методы эколого-биохимического тестирования и мониторинга природных сред // Финно-угорский мир: состояние природы и региональная стратегия защиты окружающей среды, Сыктывкар, 2000. С. 134–140.

Сидоров В. С. Проблемы антропогенной экологии // Научные аспекты экологических проблем России. М.: Наука, 2000. Т. 1. С. 9–21.

Смирнов Л. П., Богдан В. В. Липиды в физиолого-биохимических адаптациях экотермных организмов к абиотическим и биотическим факторам среды. М.: Наука, 2007. 184 с.

Ткачук В. А. Фосфоинозитидный обмен и осцилляция ионов Ca^{2+} (обзор) // Биохимия. 1998. Т. 63, вып. 1. С. 47–56.

Фокина Н. Н., Нефедова З. А., Немова Н. Н. Липидный состав мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря. Влияние некоторых факторов среды обитания. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2010. 243 с.

Фокина Н. Н., Нефедова З. А., Немова Н. Н., Халаман В. В. Модулирующая роль липидов и их жирных кислот в адаптивной функции мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря при изменении солёности // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 2007. Т. 43. С. 379–387.

Фокина Н. Н., Нефедова З. А., Немова Н. Н. Биохимические адаптации морских двустворчатых моллюсков к аноксии (обзор) // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2011. № 3. С. 121–130.

Хлебович В. В. Акклимация животных организмов. Л., 1981. 135 с.

Хлебович В. В. Критическая солёность биологических процессов. Л.: Наука, 1974. 203 с.

Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимические адаптации. М.: Мир, 1980. 568 с.

Цюпко А. Н., Дудник Л. Б., Евстигнеева Р. П., Алесенко А. В. Влияние восстановленной и окисленной форм глутатиона на активность сфингомиелитазы и содержание сфингомиелина и продуктов перекисного окисления липидов в печени мышей // Биохимия. 2001. Т. 66, вып. 9. С. 1263–1270.

Чурова М. В., Мещерякова О. В., Ильмаст Н. В., Немова Н. Н. Оценка состояния сегов *Coregonus lavaretus* L., обитающих в хвостохранилище горно-обогатительного комбината, по некоторым биохимическим и молекулярно-генетическим показателям // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2011. № 3. С. 137–145.

Шатуновский М. И., Рубан Г. И., Акимова Н. В. О популяционных и онтогенетических механизмах регуляции воспроизводства рыб. Успехи современной биологии. 2007. Т. 127, № 1. С. 87–96.

- Шатуновский М. И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 283 с.
- Шмид-Ниельсен К. Физиология животных: приспособление и среда. М.: Мир, 1982. 416 с.
- Bakhmet I. N., Fokina N. N., Nefedova Z. A., Nemova N. N. Physiological-biochemical properties of blue mussel *Mytilus edulis* adaptation to oil contamination // Environmental Monitoring and Assessment. 2009. Vol. 155. P. 581–591.
- Bakhmet I. N., Kantserova N. P., Lysenko L. A., Nemova N. N. Effect of copper and cadmium ions on heart function and calpain activity in blue mussel *Mytilus edulis* // J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 2012. Vol. 47., № 11 P. 1528–1535.
- Di Paolo G. P. de Camilli. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics // Nature. 2006. Vol. 443 (7112). P. 651–657.
- Dong Y., Somero G. Temperature adaptation of cytosolic malate dehydrogenase of limpets: differences in stability and function due to minor changes in sequences correlate with biogeography and vertical distribution // J. Exper. Biology. 2009. Vol. 212. P. 169–177.
- Fokina N. N., Ruokolainen T. R., Nemova N. N., Bakhmet I. N. Changes of blue mussels *Mytilus edulis* L. lipid composition under cadmium and copper toxic effect // Biological Trace Element Research. 2013. Vol. 154, N 2. P. 217–225.
- Gillis T. E., Ballantyne J. S. Influences of subzero thermal acclimation on mitochondrial membrane composition of temperate zone marine bivalve mollusks // Lipids. 1999. Vol. 34, N 1. P. 59–66.
- Guderley H. Locomotor performance and muscle metabolic capacities: impact of temperature and energetic status // Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. 2004. Vol. 139. P. 371–382.
- Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. New York: Oxford University press, 2002. 466 p.
- Kraffe E., Marty Y., Guderley H. Changes in mitochondrial oxidative capacity during thermal acclimation of rainbow trout: roles of membrane proteins, phospholipids and its fatty acid composition // J. Exper. Biology. 2007. Vol. 210. P. 149–165.
- Larade K., Storey K. B. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. In: Cell and molecular responses to stress. 2002. Vol. 3. Sensing, signaling and cell adaptation. 346 p.
- Lucassen M., Schmidt A., Eckerle L. G., Pörtner H. O. Mitochondrial proliferation in the permanent vs. temporary cold: enzyme activities and mRNA levels in Antarctic and temperate zoarcid fish // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2003. Vol. 285. P. 1410–1420.
- Meshcheryakova O. V., Churova M. V., Nemova N. N. Mitochondrial lactate oxidation: mechanism and importance at the temperature adaptation. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 2012. Vol. 163 A, N 1. Supplement. P. 5–6.
- Moiseenko T., Kudryavtseva L. Trace metal accumulation and fish pathologies in areas affected by mining and metallurgical enterprises in Kola region, Russia // Environmental Pollution. 2002. Vol. 114. P. 285–297.
- Nemova N. N., Fokina N. N., Nefedova Z. A., Ruokolainen T. R., Bakhmet I. N. Modifications of gill lipid composition in littoral and cultured blue mussels *Mytilus edulis* L. under the influence of ambient salinity // Polar Record. 2013. Vol. 49(03). P. 272–277.
- O'Brien K. M. Mitochondrial biogenesis in cold-bodied fishes // J. Exp. Biol. 2011. Vol. 214. P. 275–285.
- Orczewska J. I., Hartleben G., O'Brien K. M. The molecular basis of aerobic metabolic remodeling differs between oxidative muscle and liver of threespine sticklebacks in response to cold acclimation // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2010. Vol. 299. P. 352–364.
- Pörtner H. O., Bennett A. F., Bozinovic F., Clarke A., Lardies M. A., Lucassen M., Pelster B., Schiemer F., Stillman J. H. Trade-offs in thermal adaptation: the need for a molecular to ecological integration. Physiol. Biochem. Zool. 2006. Vol. 79(2). P. 295–313.
- Rabinovich A. L., Balabaev N. K., Alinchenko M. G., Voloshin V. P., Medvedev N. N., Jedlovsky P. Computer simulation study of intermolecular voids in unsaturated phosphatidylcholine lipid bilayers // J. Chem. Phys. 2005. Vol. 122. P. 084906_1–084906_12.
- Shulman G. E., Love R. M. Advances in marine biology. Vol. 36. The Biochemical Ecology of Marine Fishes. In.: Advances in Marine Biology. N.Y.: Academic Press. 1999. 361 p.
- Somero G. N. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. 2004. Vol. 139, N 3. P. 321–333.
- Somero G. N. Temperature Relationships: From Molecules to Biogeography. Comprehensive Physiology, 2011. N 1. Published Online: 2011.
- Somero G. N. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers' // J. Exp. Biol. 2010. Vol. 213(6). P. 912–920.
- Somero G. N. The physiology of global change: linking patterns to mechanisms. // Ann. Rev. Marine Science. 2012. N 4. P. 39–61.
- White C. R., Alton L. A., Frappell P. B. Metabolic cold adaptation in fishes occurs at the level of whole animal, mitochondria and enzyme // Proc. Biol. Sci. 2012. Vol. 279, № 1734. P. 1740–1747.
- Zakhartsev M., Lucassen L., Kulishova L., Deigweier K., Smirnova Y. A., Zinov'eva R. D., Mugue N., Baklushinskaya I., Pörtner H. O., Ozernyuk N. D. Differential expression of duplicated LDH-A genes during temperature acclimation of weatherfish *Misgurnus fossilis*. Functional consequences for the enzyme // FEBS J. 2007. Vol. 274. P. 1503–1513.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Немова Нина Николаевна

директор, чл.-корр. РАН, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 783615

Мещерякова Ольга Владимировна

и.о. зав. лаб. экологической биохимии, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: mesch@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 571879

Лысенко Людмила Александровна

ведущий научный сотрудник лаб. экологической биохимии,
к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: l-lysenko@yandex.ru
тел.: (8142) 571879

Фокина Наталья Николаевна

старший научный сотрудник лаб. экологической биохимии,
к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: fokinann@gmail.com
тел.: (8142) 571879

Nemova, Nina

Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nemova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 783615

Meshcheriakova, Olga

Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: mesch@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 571879

Lysenko, Lyudmila

Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: l-lysenko@yandex.ru
tel.: (8142) 571879

Fokina, Natalia

Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: fokinann@gmail.com
tel.: (8142) 571879

УДК 575.857:575.826

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ

Л. В. Топчиева, О. М. Федоренко

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Обзор посвящен современным подходам и методам, используемым для изучения молекулярных основ адаптации популяций. Рассмотрены современные понятия адаптации популяций и основные подходы для отбора генов-кандидатов, участвующих в этом процессе. Приведены молекулярно-генетические методы, используемые для изучения роли мутаций и эпигенетических механизмов в адаптации организмов и популяций.

К л ю ч е в ы е с л о в а: адаптация, популяции, генотип, фенотип, экспрессия генов, эпигенетические механизмы, метилирование ДНК.

L. V. Topchieva, O. M. Fedorenko. METHODOLOGICAL APPROACHES TO STUDYING THE MOLECULAR MECHANISMS OF ADAPTATION IN POPULATIONS

The review is devoted to the modern approaches and methods used to study the molecular basis of adaptation in populations. The modern concepts of population adaptation and basic approaches to the selection of candidate genes involved in this process are discussed. Molecular genetic methods used to study the role of mutations and epigenetic mechanisms in adaptations of organisms and populations are considered.

K e y w o r d s: adaptation, populations, genotype, phenotype, gene expression, epigenetic mechanisms, DNA methylation.

Введение

В последние годы стремительно возросло количество работ, посвященных методическим подходам для исследования адаптации популяций растений и животных [Geffenew et al., 2005; Whitehead, Crawford, 2006; Ellegren, Sheldon, 2008; Feldman et al., 2009]. При этом особенное внимание в них уделяется изучению генетических и эпигенетических механизмов приспособления. Повышение интереса к проблеме адаптации популяций очевидно связано с разработкой и широким внедрением в эти

исследования новых подходов и методов, в том числе успешно развиваемых в молекулярной биологии. Однако особенности организации и функционирования отдельных организмов и популяций могут обуславливать применение разных подходов и методов для оценки уровня и механизмов их приспособленности.

Кратко остановимся на понятии «адаптация популяций». Популяциям растений и животных, как и любым живым системам, присущи саморегуляция, самоорганизация и адаптация (приспособление). Существуют различные определения и классификации адаптации, обобщен-

ные в работе [Шкорбатов, 1982]. Г. Л. Шкорбатов, согласно принципам системного исследования, ввел понятие адаптации как совокупности реакций живой системы, поддерживающих ее функциональную устойчивость при изменении условий окружающей среды, подчеркивая динамические качества этой устойчивости. Им же разработана классификация адаптаций в соответствии с основными типами существующих в природе биологических систем. Приспособление на популяционно-видовом уровне он относит к адаптации филогенетических систем, считая, что ее отличительными особенностями являются групповой характер, низкая скорость возникновения и относительно высокая стабильность. Возникновение и угасание этих адаптаций происходят в генофонде всей адаптирующейся группы. Причем изменения в генетическом аппарате могут иметь значение для адаптации в том случае, если возникший в данной популяции новый генотип распространяется, будучи подхваченным естественным отбором [Тимофеев-Ресовский и др., 1969]. Понятие приспособления, или адаптации, также подразумевает «запас прочности» биологических систем, а в нашем случае популяций, который многократно ими используется при повторных однотипных изменениях окружающих условий [Шкорбатов, 1982]. По мнению Ю. П. Алтухова, запас генетической прочности популяций представляет собой адаптацию к конкретной среде, с которой они сталкивались в прошлом и которая оказалась «записанной» в их генотипической структуре [Алтухов, 2003].

Факторы адаптивных изменений генетической структуры популяций

Принято считать, что в адаптивных изменениях генетической структуры популяций основную роль играют мутационный процесс и естественный отбор, а также такие факторы, как поток генов, генетический дрейф [Хедрик, 2003; Hereford, 2009]. Согласно Р. Фишеру, приспособленность популяций монотонно возрастает под давлением естественного отбора [Алтухов, 2003]. Однако это положение имеет ряд ограничений, например, для популяций с инбридингом и частотно-зависимым отбором [Животовский, 1981]. По Ю. П. Алтухову, современные нативные популяции достигли максимума адаптации и поддерживают экологическое равновесие с окружающей средой [Алтухов, 2003]. Но существует и другая точка зрения. Несмотря на действие стабилизирующего отбора, популяции не находятся в адаптивном оптимуме [Orzack, Sober, 1994]. Об этом свидетельствуют некото-

рые факты. Как правило, генотипы аборигенных представителей лучше адаптированы к условиям среды обитания [Schluter, 2000], тем не менее в популяции можно обнаружить индивидуумы, имеющие более низкую приспособленность к конкретным условиям среды, чем помещенные в эти условия особи из других популяций [Hereford, Winn, 2008].

На ход процессов адаптации популяций может оказывать влияние уровень их генетического разнообразия. В малочисленных популяциях из-за дрейфа генов, когда «успешные» аллели достигают высокой частоты, а «вредные» аллели фиксируются вследствие наличия генетического груза, уровень генного разнообразия может оказаться низким и ограничить адаптацию [Lynch, 2007].

В основе адаптаций лежит мутационный процесс, приводящий к появлению новых аллелей. Вновь возникающие мутации, как правило, вредны для организма [Алтухов, 2003]. Поэтому обнаруживаемое разнообразие генных локусов в популяции поддерживается за счет доли селективно-нейтральных аллелей. Подавляющее большинство мутаций рецессивно, и при высокой численности популяций они оказываются в гетерозиготном состоянии. Как полагал С. С. Четвериков, вновь возникающие аллели, не проявляя вредного эффекта в гетерозиготах, могут постепенно включаться в генофонд вида [Алтухов, 2003], являясь «сырьем» для естественного отбора. И, как было уже отмечено, значение этих аллелей в адаптации будет проявляться в том случае, если их частота в популяции станет ощутимой и они будут подхвачены естественным отбором.

При рассмотрении молекулярных механизмов адаптации возникает еще несколько вопросов. Например, эволюционирует отдельный ген или локусы, среди которых могут быть и полиаллельные генетические системы? В последнее время принято считать, что природная популяция бисексуальных видов эволюционирует одновременно по множеству локусов [Алтухов, 2003]. Соответствующие генотипы могут взаимодействовать между собой, гены могут быть сцепленными или их комбинации оказываются неслучайными под действием отбора [Алтухов, 2003]. Другой вопрос касается важности для приспособления так называемой морфологической эволюции и эволюции регуляторных систем. Одни авторы придерживаются точки зрения, что основным молекулярным механизмом приспособления являются изменения в транскрибируемых нуклеотидных последовательностях, приводящие к замене аминокислот и изменению структуры белка

[Hoekstra, Coyne, 2007]. Другие авторы полагают, что в основе формирования новых адаптированных фенотипов лежат изменения в регуляции экспрессии генов, обусловленные мутациями в регуляторных или, иначе, в *cis*-областях гена [Carroll, 2005]. Еще более 30 лет назад Кинг и Уилсон [King, Wilson, 1975], исследуя схожесть белков человека и шимпанзе, пришли к заключению, что наблюдаемые фенотипические различия между этими видами могут быть обусловлены различиями скорее в регуляции экспрессии генов, нежели в структуре кодируемых ими белков. На модельных объектах *Drosophila* и дрожжах рода *Saccharomyces* было показано, что ключевым механизмом фиксации некоторых фенотипических различий у этих объектов является возникновение мутаций в регуляторных частях генов [Borneman et al., 2007; McGregor et al., 2007]. В литературе также имеются сведения и в пользу важности для формирования новых адаптаций изменений в структурных областях генов [French-Constant et al., 1993]. Очевидно, что в естественных популяциях эволюция локусов, связанных с приспособлением, может осуществляться за счет возникновения мутаций как в регуляторных, так и в структурных областях генома [Ellegren, Sheldon, 2008]. Из этого следует, что методы и подходы для исследования молекулярных основ адаптации могут быть весьма разнообразными.

Методы выявления адаптивной генетической изменчивости

Поиску генов, которые позволяют популяциям адаптироваться к конкретным условиям среды обитания, в настоящее время посвящено много работ [Powers, Schulte, 1998; Geffenev et al., 2005; Whitehead, Crawford, 2006; Feldman et al., 2009]. Все они основаны на использовании разных подходов для изучения связи между фенотипом и генотипом. Эллегрен и Шелдон [Ellegren, Sheldon, 2008], обобщая накопившийся к настоящему моменту материал о методах исследования этой взаимосвязи, предложили схему отбора кандидатных генов, участвующих в приспособлении (рис.).

Анализ сцепления является традиционным способом идентификации участка хромосом, содержащего локусы, ответственные за те или иные количественные признаки. Этот подход называется «анализ локусов количественных признаков» (QTL, Quantative Trait Locus) и позволяет эффективно картировать и идентифицировать гены, определяющие сложные (полигенные) признаки. Метод устанавливает точ-

ную локализацию, количество, эффект взаимодействия QTLs. Для картирования QTL нужна сегрегированная популяция, полученная путем скрещивания двух родительских форм, которые различались бы по признаку, интересующему исследователя. Для признаков, контролируемых десятками или сотнями генов, родительские линии могут не различаться по ним фенотипически, но должны содержать различные аллели, которые в результате рекомбинационных событий мейоза дадут в поколении потомков целый спектр фенотипических проявлений выбранного признака [Сергеева, 2011]. Следует подчеркнуть, что QTL – это не ген, а только участок хромосомы, где расположен ген или группа генов, обнаруживающих значительное влияние на признак. Для идентификации этих генов необходимо использовать другие методы.

Для проведения QTL-анализа исследователю необходимо две или более линии организмов одного вида, которые различаются генетически по отношению к интересующему признаку. Также требуются генетические маркеры, которые бы позволили отличить родительские линии между собой. В последнее время для этих целей все чаще используют микросателлитные последовательности ДНК, которые могут быть расположены близко к генам, контролирующим признак. Необходимым условием проведения QTL-анализа является конструирование карт сцепления, которые указывают позицию маркеров и относительные генетические расстояния между маркерами вдоль хромосом. С помощью карт сцепления устанавливают местоположение генов и QTLs, связанных с интересующим признаком. QTL-картирование основано на принципе разделения генов и маркеров при рекомбинации хромосом. Это позволяет анализировать их в потомстве F₂ и сравнивать с родительскими формами. Частота рекомбинантных генотипов может быть использована для расчета генетического расстояния между маркерами. Чем ниже частота рекомбинации между двумя маркерами, тем ближе они расположены на хромосоме, и наоборот. Карты сцепления строятся на основе анализа множества сегрегирующих маркеров.

Приведем некоторые примеры использования QTL-анализа для поиска генетических локусов, ответственных за формирование определенного фенотипа. QTL-картирование было использовано для идентификации QTLs локусов, ответственных за вариабельность такого признака, как «время начала цветения», у 17 F₂ популяций *Arabidopsis thaliana* [Salome et al.,

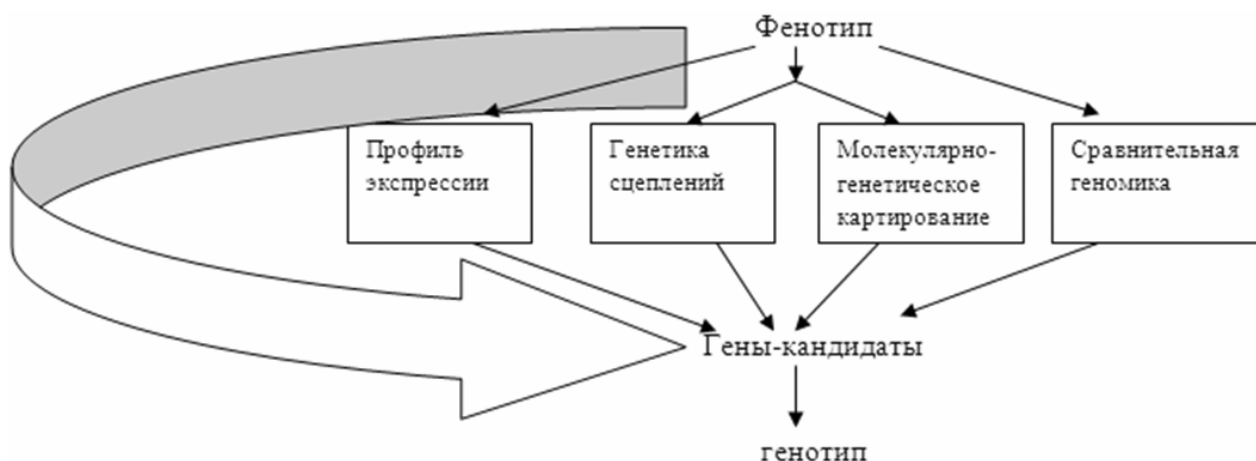


Схема изучения связи между фенотипом и вариациями генотипов [Ellegren, Sheldon, 2008]

2011]. Высоковариабельный признак «время начала цветения» *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. является одной из важнейших физиологических характеристик растений и четко связан с приспособленностью [Pigliucci, 1998]. В последнее время среди исследователей сложилось представление, что этот признак является определяющим в адаптации арабидопсиса к условиям окружающей среды [Koornneef et al., 1991, 1998; Coupland, 1995; Kuittinen et al., 1997], к тому же он проявляет широтную клинальную изменчивость [Stinchcombe et al., 2004]. Вместе с прорастанием семян эта характеристика синхронизирует рост и репродукцию растений с наиболее благоприятным периодом вегетации [Symonides, 1987] и таким образом обеспечивает сохранение вида в череде поколений. Наличие клинальной изменчивости часто служит прямым доказательством действия естественного отбора [Левонтин, 1978] и участия в адаптации генов, контролирующих эту изменчивость.

С помощью данного метода был обнаружен основной QTL-кластер, связанный с контролем времени зацветания и включающий пять геномных областей [Salome et al., 2011]. Оказалось, что эти области содержат гены транскрипционных факторов FLC/MAF (FLOWERING LOCUS C/MADS AFFECTING FLOWERING). Для QTL-картирования в качестве ДНК-маркеров авторы использовали однонуклеотидные замены.

Методику QTL-анализа и ассоциативного картирования использовали для исследования хромосомных локусов, ассоциированных со временем перехода к цветению в двуродительской расщепляющейся популяции линий двойных гаплоидов и в стержневой коллекции местных и селекционных сортов-популяций *Brassica rapa* [Артемьева и др., 2012]. Авторы

нашли и картировали хромосомные локусы, расположенные во 2, 3, 5, 6, 7 и 10-й группах сцепления, и установили AFLP-, SSR- и S-SAP-маркеры, сцепленные со временем цветения.

Для поиска генов, участвующих в адаптации популяций, также используется подход, основанный на получении информации о нуклеотидных последовательностях организмов. Суть этого подхода состоит в установлении и сравнении нуклеотидных последовательностей особей из разных популяций, двух и более видов. Таким образом, можно определить области, включающиеся в негативную или положительную селекцию. Следует отметить, что данный подход, несмотря на сложность и высокую стоимость такого рода исследований, в последнее время используется довольно часто, особенно для изучения приспособления экологически важных или редких видов растений и животных [Ellegren, Sheldon, 2008].

Отбор генов-кандидатов может осуществляться и на основе знаний биохимии и экологических характеристик того или иного вида в комплексе с методами прямой генетики. К примерам использования такого подхода можно отнести исследования роли полиморфизма гена фосфоглюкозоизомеразы в термоадаптации у бабочки рода *Colias* [Watt et al., 2003], гена лактатдегидрогеназы в адаптации к холодным условиям среды у костной рыбы *Fundulus heteroclitus* [Place, Powers, 1984], роли генов синтеза пигментов в адаптивном цветовом паттерне прибрежных мышей [Hoekstra et al., 2006] и др.

Остановимся более подробно на одном из примеров. *Fundulus heteroclitus* – маленькая костная рыба, обитающая в болотах и эстуариях вдоль побережья Северной Америки. Температура воды для южных и северных популяций

в один и тот же сезон отличается примерно на 13 °С. Пауэрс и Плейс [Powers, Place, 1978] исследовали аллозимный спектр этих популяций, включая лактатдегидрогеназу (LDH-B), фермент, катализирующий превращение пирувата в лактат. Проверив кинетику очищенных LDH-B-ферментов *in vitro*, они обнаружили, что фермент, выделенный из особей, принадлежащих северным популяциям, имеет большую каталитическую способность при низких температурах [Place, Powers, 1984]. Анализ нуклеотидных последовательностей аллелей гена *ldh-b* показал, что функциональные отличия этих изоферментов обусловлены, вероятнее всего, заменой аминокислот в сайте 311 (Ala-Asp) (аллель *ldh-bnn*). Кроме этого авторы обнаружили корреляцию *ldh-b* генотипа с концентрацией АТФ в эритроцитах крови. Поскольку АТФ снижает способность связывания гемоглобином кислорода, было высказано предположение [DiMichele, Powers, 1982], что рыбы из северных популяций, имеющие *ldh-bnn* аллель, обладают более эффективной загрузкой кислорода работающими мышцами и лучшими плавательными характеристиками. Как и ожидалось, *ldh-bnn* рыбы имели более высокую концентрацию АТФ, более низкую гемоглобин-кислородную аффинность и лучшие плавательные характеристики при температуре воды 10 °С. Однако в теплой воде эти различия не были выявлены [DiMichele, Powers, 1982]. Более того, дальнейшие исследования показали, что *ldh-bnn* эмбрионы характеризовались более низкой скоростью метаболизма, в том числе лактатного, замедленным развитием, более поздним вылуплением. Поскольку самки *Fundulus heteroclitus* откладывают яйца в середине весны и их яйца вынуждены развиваться на воздухе, это позволяет получить им некоторые преимущества для выживания, а именно способность вылупляться на две недели позже в более теплой водной среде.

Другим примером, подтверждающим эффективность данного подхода для изучения молекулярных основ устойчивости и приспособления, являются исследования роли вольт-воротных натриевых каналов (Nav 1.4) в устойчивости популяций подвязочной змеи *Tamnophis sialis* к тетродотоксину [Brodi et al., 2002]. *Tamnophis sialis* питается оригонским тритоном (*Taricha granulose*) и обитает в восточной части Северной Америки. Для защиты от хищника тритоны на своей коже содержат тетродотоксин (ТТХ). ТТХ – нейротоксин, который обладает способностью блокировать натриевые каналы (Nav) в цитоплазматической мембране нервных клеток и мускулов, что в

свою очередь ингибирует инициацию потенциала действия. При попадании внутрь даже минимального количества яда мускулы змей парализуются, приводя к смерти этих животных от удушья. Оказалось, что змеи из популяций, питающихся оригонскими тритонами, более устойчивы к ТТХ, чем змеи из популяций, в рацион которых не входит это животное [Brodie et al., 2002]. Более того, содержание ТТХ на коже у тритонов географически коррелирует с уровнем устойчивости змей в популяциях [Brodie, Brodie, 1991; Hanifin et al., 1999]. В дальнейшем на основании лабораторных экспериментов установили, что способность к движению у животных после вспыскивания ТТХ строго коррелировала со способностью клеток генерировать потенциал действия [Geffeney et al., 2002]. Была предложена гипотеза о генетической природе этой устойчивости. Основываясь на знаниях о механизмах действия тетродотоксина (а именно – его способности связываться с натриевыми каналами), авторы высказали предположение, что невосприимчивость к яду может быть обусловлена наличием устойчивых к нему натриевых каналов. Исследование различий в нуклеотидных последовательностях гена, кодирующего белок натриевого канала, показало, что во всех устойчивых популяциях обнаруживается одна несинонимичная мутация, способствующая уменьшению связывания ТТХ с натриевым каналом и повышающая устойчивость к этому нейротоксину [Geffeney et al., 2005]. Кроме этой мутации в большинстве популяций были обнаружены еще 1–3 дополнительные мутации, снижающие токсический эффект ТТХ. Недавно было показано, что два родственных подвязочной змее вида, *Tamnophis atratus* и *Th. couchii*, также имеют ТТХ-устойчивые популяции [Feldman et al., 2009]. Причем однонуклеотидные замены в гене, кодирующем белок внешней поры Nav 1.4 канала, коррелируют с ТТХ-устойчивостью у этих видов. Данный факт может быть примером конвергентной эволюции на уровне нуклеотидов с параллельной эволюцией на более высоком уровне организации. Полиморфизм генов, кодирующих белки натриевых каналов, лежит в основе устойчивости к структурно или функционально подобным ТТХ нейротоксинам, сакситоксинам у двухстворчатых моллюсков [Bricelj et al., 2005; Soong, Venkatesh, 2006].

В последнее время особенное внимание при отборе кандидатных генов, участвующих в адаптации популяций различных видов растений и животных, уделяется транскрипционной активности генома [Whitehead, Crawford, 2006].

Как уже отмечалось, изменения в регуляторных областях генов, а также в генах, кодирующих транскрипционные факторы, могут привести к существенным различиям в экспрессии генов у особей из разных популяций одного и того же вида и формированию новых фенотипов. Яркий тому пример – разнообразие популяций *Arabidopsis thaliana* по признаку «время начала цветения», которое обусловлено вариативностью генов транскрипционных факторов, содержащих MADS-домен [Koornneef et al., 1998]. Мутации в так называемых *cis*-элементах генов могут обуславливать различный уровень экспрессии этих генов. У упомянутой выше рыбы *Fundulus heteroclitus* между северными и южными популяциями были обнаружены различия в содержании лактатдегидрогеназы, которые, по всей вероятности, зависят от уровня транскриптов гена, кодирующего этот фермент [Schulte et al., 1997]. Сравнение нуклеотидных последовательностей аллелей гена лактатдегидрогеназы у *Fundulus heteroclitus* показало, что различия в его транскрипционной активности обусловлены наличием полиморфных сайтов в промоторе [Schulte et al., 1997, 2000].

Для исследования транскриптома используются различные методы. Например, метод дифференциального дисплея [Liang, Pardee, 1992], кДНК-AFLP [Bachem et al., 1996], серийный анализ геной экспрессии (SAGE) [Velculescu et al., 1995], масс-спектрометрия, белковые и ДНК-микроматрицы.

Одним из наиболее распространенных современных методов, позволяющих сравнивать транскриптомные профили, является метод ДНК Microarray (ДНК-микроматрицы), заключающийся в использовании фиксированных на твердом носителе (чипе) в определенном порядке большого числа строго определенных олигонуклеотидов, с которыми осуществляется взаимодействие (гибридизация) анализируемого пула кДНК. Поскольку на одном чипе можно поместить более тысячи различных олигонуклеотидных зондов (даже более 50 000), это дает возможность анализировать одновременно уровень и паттерн большого количества кДНК. Далее профиль транскриптов анализируется с помощью кластерного анализа. Описываемый подход был использован для анализа транскриптомов различных популяций некоторых видов рыб семейства *Fundulus* [Oleksiak et al., 2002]. Авторы наблюдали индивидуальную изменчивость в экспрессии ряда генов внутри популяций и значительные различия в уровне их транскрипционной активности между популяциями.

Другой современный подход, применяющийся для анализа уровня транскриптов большого количества генов, – серийный анализ геной экспрессии (SAGE) [Velculescu et al., 1995]. Его основные этапы – выделение тагов, соединение их в протяженные ряды и их массовое секвенирование. Полученные тексты обрабатывают компьютерными методами и с помощью подсчета коротких одинаковых последовательностей получают количественные данные о распределении транскриптов многих тысяч генов для разных образцов. Появление новых технологий секвенирования (NGS), основанных на детекции продуктов с помощью лигазной реакции (платформа Solid), при освобождении пирофосфата в ходе роста цепочки нуклеотидов (Roshe), флуоресценции меченого нуклеотида в результате синтеза нуклеотидной последовательности (платформа Illumina) позволили значительно упростить применение данного метода для исследования транскриптомов различных организмов.

Так, модификация данного метода SuperSAGE [Matsumura et al., 2005] была использована для сравнения транскриптомов озерной и речной популяции трехиглой корюшки (*Gasterosteus aculeatus*) после однократного или двукратного заражения тремя видами паразитов: двумя видами нематод (*Anguillicoloides crassus*, *Camallanus lacustris*) и диплостомиды (*Diplostomum pseudospathaceum*) [Lenz et al., 2013]. Показано, что однократное и двукратное заражение рыб паразитами вызывало в их клетках изменения в уровне экспрессии ряда генов. Причем между популяциями наблюдались различия как в наборе дифференциально экспрессирующихся генов, так и в уровне их транскрипционной активности. Интересно, что различия в экспрессии генов так называемого «иммунного ответа» между популяциями можно было обнаружить только после двукратного заражения их паразитами.

Другой современный метод оценки транскриптома различных организмов – анализ прочитанных фрагментов экспрессированных последовательностей (EST). Основные этапы метода заключаются в синтезе кДНК, одностороннем клонировании, создании библиотеки кДНК-клонов, частичном секвенировании каждого клона с двух сторон – получении EST, кластеризации и выравнивании EST, генерировании консенсусов, реконструирующих структуру транскриптов. Применению этого метода в экологических исследованиях посвящен обзор [Bouck, Vision, 2007]. В нем отмечается, что чаще всего этот подход используется для создания ДНК-зондов, которые в дальнейшем ис-

пользуются для анализа уровня транскриптов генов методом Microarray. Метод EST был применен для сравнительного анализа транскриптов у эндемичного (*Amphilophus astorquii*) и симпатрического (*Amphilophus zaliosus*) видов цихлиды [Elmer et al., 2010].

Следует отметить, что с ростом интереса к исследованию транскриптома в генетике популяций возникают вопросы и дискуссии относительно происхождения вариативности уровня экспрессии генов между популяциями: являются ли эти различия результатом нейтральных процессов или же селекции, действия направленного или стабилизирующего отбора [Gilad et al., 2006; Ellegren, Sheldon, 2008].

Эпигенетическая изменчивость как потенциальный источник адаптивной генетической изменчивости

Большую роль в адаптации филогенетических систем в последнее время отводят эпигенетическим механизмам. Более того, разработанная М. А. Шишкиным [1984] и основанная на представлениях К. Х. Уоддингтона и И. И. Шмальгаузена эпигенетическая теория эволюции находит все больше сторонников среди специалистов, занимающихся популяционными исследованиями. Как отмечает Д. Л. Гродницкий [2004], «эволюционное изменение начинается, когда популяция попадает в непривычные условия существования. Новые внешние факторы воздействуют непосредственно на онтогенез особей и вызывают появление значительного числа необычных фенотипов – морфозов. Морфозы наследуются неустойчиво и представляют новый материал для естественного отбора. Если какой-либо из вновь появившихся морфозов оказывается способным существовать в изменившихся условиях, то естественный отбор приводит к генетической ассимиляции этого морфоза [Waddington, 1975] и к реорганизации популяционного генома, так что морфоз приобретает наследственную обусловленность и далее реализуется онтогенезом вне зависимости от внешних условий».

Действительно, в результате антропогенной нагрузки на экосистемы, а также применения искусственного отбора в популяциях некоторых животных за довольно непродолжительный период можно наблюдать быстрые направленные перестройки фенотипа [Шапошников, 1961, 1965; Васильева и др., 2003; Баранов, 2007; Ansorge et al., 2009]. О таких быстрых адаптивных изменениях могут свидетельствовать результаты экспериментов Г. Х. Шапошникова [1965]. Он менял места обитания партеногенетического потомства самок разных

рас тлей, пересаживая их с одного растения-хозяина на другое. Оказалось, что к концу эксперимента (конец сезона) тли-переселенцы полностью адаптировались к новым условиям и изменили фенотип, а именно – они приобрели морфологический облик аборигенных рас тлей, исходно обитавших на данном растении-хозяине. Как полагает А. Г. Васильев [2009], в основе таких адаптивных перестроек лежат эпигенетические механизмы.

Удобным подходом для оценки быстрых эпигенетических процессов в популяциях животных является разработанная А. Г. Васильевым [1988] методика, основанная на подсчете частот проявления дискретных вариаций неметрических признаков – фенов. В каждой выборке производится кодирование проявления фенов разных признаков единицами, а их отсутствия – нулями. За единицу наблюдения принимается сторона тела, а не целая особь. После выбраковки признаков, связанных с возрастом, полом, друг с другом и общими размерами, проводится многомерная ординация внутри индивидуальных фенетических композиций с использованием метода главных компонент. Затем по полученным значениям главных компонент между выборками проводится дискриминантный анализ. Использование этого подхода позволило оценить эпигенетическую изменчивость у ряда представителей семейства псовых при доместификации, интродукции и акклиматизации [Трут и др., 2004; Ansorge et al., 2009]. Техногенные факторы также могут способствовать быстрым изменениям фенотипов в популяциях животных. Например, отчетливые признаки быстрых эпигенетических перестроек по комплексу фенов неметрических признаков скелета речного окуня (*Perca fluviatilis*) при хроническом радиоактивном облучении популяционных группировок, обитающих в Теченском каскаде водохранилищ НПО «Маяк» на Южном Урале в течение последних 50 лет, выявил В. Ю. Баранов [2007].

В молекулярной биологии под эпигенетической регуляцией понимают механизмы изменения экспрессии генов, не затрагивающие последовательность нуклеотидов в ДНК. В основе эпигенетической наследственности могут находиться различные механизмы, включая транспозицию мобильных элементов, эффекты метилирования ДНК, реструктуризацию хроматина за счет метилирования или ацетилирования гистоновых белков, наличие разных сплайсосомных вариантов мРНК и др. Один из примеров эпигенетического подавления экспрессии генов – инактивация одной из X-хромосом в клетках женского организма. В начале эм-

брионального развития женщин одна из двух Х-хромосом случайным образом и постоянно неактивна в подавляющем числе соматических клеток [Heard, Disteché, 2006]. Примером эпигенетической регуляции индивидуального развития растений является репрессия гена *FLC* у *Arabidopsis thaliana* [Bastow et al., 2004; Dennis, Peacock, 2007], которая происходит в процессе яровизации, необходимой многим растениям умеренных широт для индукции цветения.

Как отмечалось, одним из молекулярных механизмов эпигенетической наследственности может быть метилирование ДНК. Роль метилирования ДНК в регуляции генетических процессов и формировании новых фенотипов достаточно полно обсуждена в ряде обзоров [Madlung, Comai, 2004; Ванюшин, 2006; Angers et al., 2010; Law, Jacobsen, 2010; He et al., 2011]. В клетках эукариот ядерная ДНК подвержена энзиматическому метилированию с образованием остатков 5-метилцитозина в основном в CG и CNG последовательностях. При репликации ДНК на вновь синтезированной цепи с помощью ДНК-метилтрансфераз происходит заполнение отсутствующих метиловых групп. Метилирование ДНК у растений и животных видо-, ткане- и органоспецифично, оно изменяется с возрастом и регулируется гормонами. С другой стороны, метилирование генома может определять уровень ряда гормонов. Метилирование ДНК контролирует все генетические процессы в клетке (репликация, транскрипция, репарация ДНК, рекомбинация, транспозиция генов) и является механизмом клеточной дифференцировки, дискриминации и репрессии генов. О важности процессов метилирования для жизнедеятельности клеток и организмов в целом свидетельствует тот факт, что нокаутные мутации хотя бы одного из трех генов, кодирующих метилтрансферазы (*Dnmt1*, *Dnmt3a* и *Dnmt3b*), являются летальными [Goll, Bestor, 2005]. Изменение метилирования ДНК, а именно островков CpG в промоторных частях гена, может вызвать развитие различных патологий, например, изменение нормального фенотипа животных клеток на опухолевый [Mompalmer, Bovenzi, 2000]. Ингибирование метилирования ДНК у растений сопровождается, в частности, индукцией генов запасных белков и изменением времени цветения [Soppe et al., 2000]. Однако, несмотря на все возрастающее внимание к проблеме роли метилирования ДНК в процессе жизнедеятельности клеток и организмов, основная часть паттерна метилирования ДНК еще не исследована. Так, к 2006 году было проанализировано менее 0,1 % профиля метилирования генома человека [Schumacher et al., 2006].

Для изучения роли метилирования ДНК в процессах развития особей, в формировании различных патологий, а также эпигенетических адаптивных перестройках популяций растений и животных можно использовать методы, позволяющие оценить статус метилирования ДНК. Эти методы довольно разнообразны и включают использование бисульфитной конверсии, метилчувствительных эндонуклеаз рестрикции, метилсвязывающих белков и антиметилцитозиновых антител. Использование этих методов совместно с технологиями ДНК-микрочипов и высокопроизводительным секвенированием позволяет оценить статус метилирования не только единичного гена, но и генома в целом.

Следует заметить, что многие методы оценки статуса метилирования ДНК были разработаны лишь в последние годы [Bibikova et al., 2006; Schumacher et al., 2006; Zilbermann et al., 2007; Su et al., 2013]. Основаны они на трех подходах: бисульфитной конверсии, рестрикции метилчувствительными рестриктазами и аффинной очистке метилированной ДНК. Кратко рассмотрим все три подхода.

Бисульфитная конверсия. Метилированный цитозин имеет характеристики, очень схожие с неметилированным основанием, и поэтому их сложно различить с помощью стандартных методов секвенирования. Для того чтобы обойти это препятствие, геномная ДНК должна сначала обработаться бисульфитом натрия [Clark et al., 2006], что приводит к деминированию неметилированного цитозина и превращению его в урацил. Метилированный цитозин сохраняется без изменений. При последующей ПЦР конвертированной ДНК происходит замена урацила на тимин. Далее ПЦР-продукты анализируются либо с помощью секвенирования по Сэнгеру, либо с помощью пиросеквенирования, либо с использованием масс-спектрометрии. Дополнительно проводят сравнение нуклеотидной последовательности ДНК после конверсии с последовательностью известной неметилированной ДНК, для того чтобы убедиться в полной конверсии исследуемого участка генома.

Ферменты рестрикции, чувствительные к метилированию. Для анализа метилирования ДНК часто используют метилчувствительные эндонуклеазы рестрикции [Bird et al., 1985; Lindsay, Bird, 1987]. Активность этих ферментов ингибируется или, напротив, проявляется в зависимости от метилирования сайта узнавания ДНК. В настоящее время имеется несколько методов, основанных на использовании метилчувствительных рестриктаз [Lippman et al., 2005; Khulan et al., 2006], однако в целом их

можно разделить на два основных подхода. Первый из них основан на применении метилчувствительных эндонуклеаз рестрикции для исследования метилированной ДНК, второй – неметилированной ДНК. Для анализа статуса метилирования образцы, как правило, сравнивают между собой. Например, образцы, обработанные ферментами рестрикции, и необработанные (контрольные) образцы. В другом случае сопоставляют молекулы ДНК, обработанные метилчувствительными эндонуклеазами рестрикции и их метилнечувствительными изошизомерами. В третьем варианте могут сравниваться обработанные одинаковым набором ферментов разные образцы, например, ДНК, выделенная из разных тканей организма. Выбор стратегии определяется прежде всего степенью метилирования генома. Так, известно, что в геноме человека более 60 % GC-сайтов метилировано [Goll, Bestor, 2005]. В связи с этим более удобным и экономичным подходом будет обогащение неметилированной ДНК. Например, оба сравниваемых образца подвергаются расщеплению метилчувствительными изошизомерами, узнающими последовательность CCGG: HpaII, которая не активна при метилировании GC-пары, и MspI, активность которой не ингибируется метилированием. При обработке ДНК MspI образуется большое количество более коротких по длине фрагментов ДНК, которые затем элиминируются. Таким образом, сравниваться и анализироваться будет только неметилированная часть исследуемой ДНК. Другая полезная для изучения плотно метилированной ДНК эндонуклеаза рестрикции – MsrBC [Lippman et al., 2004].

После фракционирования ДНК-фрагментов по размеру они могут быть проанализированы разными методами, например, клонированы и секвенированы, проанализированы на ДНК-микрочипах.

Метилчувствительные ферменты могут использоваться и для анализа метилирования небольших участков гена. В этом случае анализу подвергаются продукты полимеразной цепной реакции. Следует отметить, что использование метилчувствительных рестриктаз для анализа метилированной ДНК ограничено, поскольку в этом случае можно анализировать GC-пары только в сайтах узнавания этих ферментов.

Аффинная очистка. Метод аффинной очистки основан на фракционировании молекул по биологическому сродству. Одну молекулу из взаимодействующей пары, например антитело, химически закрепляют на матрице сорбента, а сорбцией и элюцией второй молекулы, например антигена, управляют путем измене-

ния условий биологического взаимодействия в результате введения в элюент солей, мочевины, детергентов, конкурирующих молекул или изменения его pH. Перед аффинной очисткой исследуемая ДНК подвергается денатурации и помещается на специальные колонки. В качестве аффинного агента часто используют белок, содержащий метилсвязывающий домен, который связывает метилированные GC-сайты [Zhang et al., 2006]. Также имеются коммерчески доступные моноклональные антитела, специфически узнающие метилированный цитозин. Они могут использоваться для иммунопреципитации метилированной ДНК [Zhang et al., 2006; Weber et al., 2007]. Использование метода иммунопреципитации бывает предпочтительнее, поскольку в этом случае можно изучать метилирование не только GC-пар, но и других сайтов ДНК.

Существует ряд методов, с помощью которых можно осуществлять полномасштабный анализ метилированной ДНК. В проекте «Эпигеном человека» (www.epigenome.org) используется стандартный подход секвенирования большого количества конвертированной бисульфитом натрия ДНК из тканей и стволовых клеток человека. Таким способом было идентифицировано существенное количество тканеспецифичных дифференциально метилированных областей [Eckhardt et al., 2006]. В других исследованиях используются рестрицирующие ферменты, стандартное клонирование и секвенирование. Например, Роллинз с соавторами [Rollins et al., 2006] таким способом проанализировали почти 14 Mb (мегаоснований) неметилированной и свыше 8 Mb метилированной ДНК человека. Следует отметить, что использование этих подходов позволяет получить огромное количество информации, но они связаны с большим объемом работ и требуют значительных финансовых затрат.

В настоящее время все чаще для исследования статуса метилирования ДНК используют ДНК-микрочиповые технологии и высокопроизводительное секвенирование.

Ранее для микрочиповых исследований метилированной ДНК использовали чипы в виде нанесенных на твердую подложку пятен олигонуклеотидных зондов. Как правило, их изготавливали индивидуально в лабораториях [Lippman et al., 2004]. На данный момент имеются качественные коммерческие олигонуклеотидные чипы: чипы на четках (фирма Illumina), литографические чипы с короткими олигонуклеотидами (фирма Affymetrix), микрочипы с длинными олигонуклеотидами (фирмы NimbleGen, Agilent). Одни микрочиповые технологии предназначены

для анализа метилирования конвертированной бисульфитом натрия ДНК (Illumina), другие подходы для исследования ДНК с использованием рестрицирующих ферментов (Affymetrix) и аффинной очистки (Affymetrix).

Вместо использования микрочиповых технологий для оценки статуса метилирования ДНК можно использовать методы, основанные на высокопроизводительном секвенировании (платформа на основе пиросеквенирования (Roshe) и платформа на основе флуоресценции нуклеотидов в процессе синтеза цепи (Illumina)). Прямое секвенирование позволяет оценить не только профиль, но и уровень метилирования ДНК.

Несмотря на большое количество доступных методов исследования метилированной ДНК, их использование для широкомасштабного анализа ограничено как размером изучаемого генома, так степенью его метилирования. Например, для слабо или умеренно метилированных геномов (арабидопсис, рис, некоторые виды насекомых) рекомендуется применять методы с обогащением метилированной ДНК и последующим ее анализом с помощью микрочипов. Также в этом случае можно использовать высокопроизводительное секвенирование ДНК после бисульфитной конверсии или обогащении метилированной фракции с помощью аффинных колонок.

Как отмечалось выше, метилирование или ацетилирование гистонов может привести к изменению конформации хроматина и активности генов. Участки ДНК, не входящие в нуклеосомы (открытая конформация), отвечают за активацию генов и являются сверхчувствительными к ДНКазе I. На селективном разрезании ДНКазой I этих важных для регуляции биологических процессов участков основаны методы, позволяющие оценить изменения в структуре хроматина. Вначале для исследования доступности хроматина для ДНКазы I использовали довольно трудоемкий и малочувствительный метод разделения ДНК по Саузерну [Mather, Perry, 1983; Bender et al., 2000; Wang, Simpson, 2001]. В дальнейшем были разработаны методы, основанные на полимеразной цепной реакции [Pfeifer, Riggs, 1991; Feng, Villeponteau, 1992; McArthur et al., 2001; Dorschner et al., 2004]. В последние годы для полногеномного анализа конформации хроматина все чаще стали применять чиповые технологии и новые методы секвенирования ДНК [Weil et al., 2004; Crawford et al., 2006; Sabo et al., 2006]. Схема анализа конформации хроматина по его доступности для ДНКазы I выглядит следующим образом [Shu

et al., 2013]. На первом этапе выделяют ядра клеток. На втором этапе выделенные ядра ресуспендируют в буфере для рестрикции и делят на равные аликвоты. К ним добавляют раствор фермента разной концентрации. После инкубации и дополнительной очистки ДНК в случае анализа конформации отдельных участков хроматина проводят полимеразную цепную реакцию, в случае полномасштабного исследования образовавшиеся фрагменты фракционируют по размеру, проводят их амплификацию и мечение флуоресцентными красителями. Доступность хроматина для ДНКазы I в первом случае оценивают по количеству образовавшегося ПЦР-продукта. Во втором – по интенсивности свечения флуоресцентных меток после гибридизации образовавшихся амплификатов с олигонуклеотидами на специально разработанных микрочипах. На наш взгляд, описанный метод является довольно удобным для исследования эпигенетических перестроек организмов, связанных с модификацией хроматина.

Таким образом, для изучения механизмов адаптивных перестроек популяций животных и растений используются различные подходы, основанные на методах популяционной генетики, генетики количественных признаков и молекулярной биологии. Часто эти подходы используются совместно, что расширяет возможности исследования молекулярных механизмов адаптации популяций.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.», соглашение 8050, № г. р. 01201274586.

Литература

- Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431 с.
- Артемяева А. М., Руднева Е. Н., Цао Ж., Боннема Г., Будан Х., Чесноков Ю. В. Поиск ассоциаций молекулярных маркеров с признаком времени перехода к цветению в естественных и искусственных популяциях *Brassica rapa* L. // Сельскохозяйственная биология. 2012. № 1. С. 21–32.
- Баранов В. Ю. Эколого-морфологический анализ популяционной изменчивости рыб Уральского региона (на примере леща и речного окуня): автореф. дис. ... канд. биол. наук. Екатеринбург: ИЭРиЖ УрО РАН, 2007. 18 с.
- Васильев А. Г. Эпигенетическая изменчивость: неметрические пороговые признаки, фены и их композиции // Фенетика природных популяций. М.: Наука, 1988. С. 158–169.
- Васильев А. Г. Феногенетическая изменчивость и популяционная мерономия // Журнал общей биологии. 2009. Т. 70, № 3. С. 195–209.

- Васильева И. А., Васильев А. Г., Любашевский Н. М. и др. Феногенетический анализ популяций малой лесной мыши (*Apodemus uralensis* Pall.) в зоне влияния Восточно-Уральского радиоактивного следа // Экология. 2003. № 6. С. 325–332.
- Ванюшин Б. Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика // Генетика. 2006. Т. 42, № 9. С. 1–14.
- Гродницкий Д. Л. Эпигенетическая теория эволюции как возможная основа нового эволюционного синтеза // Журнал общей биологии. 2004. Т. 62, № 2. С. 99–109.
- Животовский Л. А. Динамика полигенных систем под действием отбора // Математические модели в экологии и генетике. М.: Наука, 1981. С. 120–148.
- Левонтин Р. С. Генетические основы эволюции. М.: Мир, 1978. 351 с.
- Тимофеев-Ресовский Н. В., Воронцов Н. Н., Яблоков А. В. Краткий очерк теории эволюции. М.: Наука, 1969. 408 с.
- Сергеева Л. И. QTL-анализ и его применение в физиологических исследованиях. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Ред. Вл. В. Кузнецова, В. В. Кузнецова, Г. А. Романова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. С. 185–200.
- Трут Л. Н., Плюснина И. З., Оськина И. Н. Эксперимент по доместикации лисиц и дискуссионные вопросы эволюции собак // Генетика. 2004. Т. 40, № 6. С. 794–807.
- Шапошников Г. Х. Специфичность и возникновение адаптации к новым хозяевам у тлей (Homoptera, Aphidoidea) в процессе естественного отбора (экспериментальные исследования) // Энтомол. обозрение. 1961. Т. 40, № 4. С. 739–762.
- Шапошников Г. Х. Морфологическая дивергенция и конвергенция в эксперименте с тлями (Homoptera, Aphidinea) // Энтомол. обозрение. 1965. Т. 44, № 1. С. 3–25.
- Шишкин М. А. Индивидуальное развитие и естественный отбор // Онтогенез. 1984. Т. 15, № 2. С. 115–136.
- Шкорбатов Г. Л. К построению общей теории адаптации // Журнал общей биологии. 1982. Т. XLIII, № 6. С. 775–787.
- Хедрик Ф. Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 588 с.
- Angers B., Castonguay E., Massicotte R. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after // Molecular Ecology. 2010. Vol. 19, N. 7. P. 1283–1295.
- Ansorge H., Ranyuk M., Kauhala K. et al. Raccoon dog, *Nyctereutes procyonoides*, populations in the area of origin and in colonized regions – the epigenetic variability of an immigrant // Ann. Zool. Fennici. 2009. Vol. 46. P. 51–62.
- Bachem C. W., van der Hoeven R. S., de Bruijn S. M., Vreugdenhil D., Zabeau M., Visser R. G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development // Plant J. 1996. Vol. 9, N. 5. P. 745–753.
- Bastow R., Mylne J. S., Lister C., Lippman Z., Martienssen R. A., Dean C. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation // Nature. 2004. Vol. 427. P. 164–167.
- Bender M. A., Bulger M., Close J., Groudine M. Beta-globin gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous beta-globin locus in mice do not require the locus control region // Mol Cell. 2000. Vol. 5. P. 387–393.
- Bibikova M., Lin Z., Zhou L., Chudin E., Garcia E. W., Wu B., Doucet D., Thomas N. J., Wang Y., Vollmer E. et al. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays // Genome Res. 2006. Vol. 16. P. 383–393.
- Bird A., Taggart M., Frommer M., Miller O. J., Macleod D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA // Cell. 1985. Vol. 40. P. 91–99.
- Borneman A. R., Gianoulis T. A., Zhang Z. D., Yu H., Rozowsky J., Seringhaus M. R., Wang L. Y., Gerstein M., Snyder M. Divergence of transcription factor binding sites across related yeast species // Science. 2007. Vol. 317. P. 815–819.
- Bricelj V. M., Connell L., Konoki K. et al. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP // Nature. 2005. Vol. 434. P. 763–767.
- Brodie E. D. III, Brodie E. D. Jr. Evolutionary response of predators to dangerous prey: reduction of toxicity of newts and resistance of garter snakes in island populations // Evolution. 1991. Vol. 45. P. 221–224.
- Brodie E. D. III, Brodie E. D. Jr. Costs of exploiting poisonous prey: evolutionary trade-offs in a predator-prey arms race // Evolution. 1999. Vol. 53. P. 626–631.
- Brodie E. D. Jr., Ridenhour B. J., Brodie E. D. III. The evolutionary response of predators to dangerous prey: hotspots and coldspots in the geographic mosaic of coevolution between garter snakes and newts // Evolution. 2002. Vol. 56. P. 2067–2082.
- Bouck A., Vision T. The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags // Molecular Ecology. 2007. Vol. 16, N 5. P. 907–924.
- Clark S. J., Statham A., Stirzaker C., Molloy P. L., Frommer M. DNA methylation: bisulphite modification and analysis // Nat. Protoc. 2006. Vol. 1. P. 2353–2364.
- Carroll S. B. Evolution at two levels: on genes and form // PLoS Biol. 2005. Vol. 3, N 7. P. 1159–1166.
- Coupland G. Genetic and environmental control of flowering time in *Arabidopsis* // Trends Genet. 1995. Vol. 11. P. 93–97.
- Crawford D. L., Powers D. A. Evolutionary adaptation to different thermal environments via transcriptional regulation // Molecular Biology and Evolution. 1992. Vol. 9. P. 806–813.
- Crawford G. E., Davis S., Scacheri P. C., Renaud G., Halawi M. J., Erdos M. R., Green R., Meltzer P. S., Wolfsberg T. G., Collins F. S. DNase-chip: a high-resolution method to identify DNase I hypersensitive sites using tiled microarrays // Nat. Methods. 2006. Vol. 3. P. 503–509.
- Dennis E. S., Peacock W. J. Epigenetic regulation of flowering // Current Opinion in Plant Biology. 2007. Vol. 10. P. 520–527.

- DiMichele L., Powers D. A. Physiological basis for swimming endurance differences between LDH-B genotypes of *Fundulus heteroclitus* // *Science*. 1982. Vol. 216. P. 1014–1016.
- Dorschner M. O., Hawrylycz M., Humbert R., Wallace J. C., Shafer A., Kawamoto J., Mack J., Hall R., Goldy J., Sabo P. J., Kohli A., Li Q., McArthur M., Stamatoyannopoulos J. Highthroughput localization of functional elements by quantitative chromatin profiling // *Nat Methods*. 2004. Vol. 1. P. 219–225.
- Eckhardt F., Lewin J., Cortese R., Rakyan V. K., Attwood J., Burger M., Burton J., Cox T. V., Davies R., Down T. A. et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22 // *Nat. Genet.* 2006. Vol. 38. P. 1378–1385.
- Ellegren H., Sheldon B. C. Genetic basis of fitness differences in natural populations // *Nature*. 2008. Vol. 452. P. 169–175.
- Elmer K. R., Fan S., Gunter H. M., Jones J. C., Boekhoff S., Kuraku S., Meyer A. Rapid evolution and selection inferred from the transcriptomes of sympatric crater lake cichlid fishes // *Molecular Ecology*. 2010. Vol. 19. P. 197–211.
- Feldman C. R., Brodie E. D. Jr., Brodie E. D. III., Pfrender M. E. The evolutionary origins of beneficial alleles during the repeated adaptation of garter snakes to deadly prey // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2009. Vol. 106. P. 13415–13420.
- Feng J., Villeponteau B. High-resolution analysis of c-fos chromatin accessibility using a novel DNase I-PCR assay // *Biochim Biophys Acta*. 1992. Vol. 1130. P. 253–258.
- French-Constant R. H., Steichen J. C., Rocheleau T. A., Aronstein K., Roush R. T. A single-amino acid substitution in a γ -aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90. P. 1957–1961.
- Geffeney S., Brodie E. D. Jr., Ruben P. C., Brodie E. D. III. Mechanisms of adaptation in a predator-prey arms race: TTX-resistant sodium channels // *Science*. 2002. Vol. 297. P. 1336–1339.
- Geffeney S. L., Fujimoto E., Brodie E. D. III., Brodie E. D. Jr., Ruben P. C. Evolutionary diversification of TTX-resistant sodium channels in a predator-prey interaction // *Nature*. 2005. Vol. 434. P. 759–763.
- Gilad Y., Oshlack A., Rifkin S. A. Natural selection on gene expression // *Trends Genet.* 2006. Vol. 22, N 8. P. 456–461.
- Goll M. G., Bestor T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases // *Annu. Rev. Biochem.* 2005. Vol. 74. P. 481–514.
- Hanifin C. T., Yotsu-Yamashita M., Yasumoto T., Brodie E. D. III., Brodie E. D. Jr. Toxicity of dangerous prey: variation of tetrodotoxin levels within and among populations of the newt *Taricha granulosa* // *Journal of Chemical Ecology*. 1999. Vol. 25. P. 2161–2175.
- He X.-J., Chen T., Zhu J.-K. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals // *Cell Research*. 2011. Vol. 21. P. 442–465.
- Heard E., Distech C. M. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome // *Genes Dev.* 2006. Vol. 20. P. 1848–1867.
- Hereford J. A quantitative survey of local adaptation and fitness trade-offs // *Am Nat.* 2009. Vol. 173, N 5. P. 579–588.
- Hereford J., Winn A. A. Limits to local adaptation in six populations of the annual plant *Diodia teres* // *New Phytol.* 2008. Vol. 178, N 4. P. 888–896.
- Hoekstra H. E., Coyne J. A. The locus of evolution: evo devo and the genetics of adaptation // *Evol. Int. J. Org. Evol.* 2007. Vol. 61. P. 995–1016.
- Hoekstra H. E., Hirschmann R. J., Bunday R. A., Insel P. A., Crossland J. P. A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern // *Science*. 2006. Vol. 313.
- King M. C., Wilson A. C. Evolution at two levels in humans and chimpanzees // *Science*. 1975. Vol. 188. P. 107–116.
- Khulan B., Thompson R. F., Ye K., Fazzari M. J., Suzuki M., Stasiek E., Figueroa M. E., Glass J. L., Chen Q., Montagna C. et al. Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay // *Genome Res.* 2006. Vol. 16. P. 1046.
- Koornneef M., Alonso-Blanco C., Peeters A. J. M., Soppe W. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis* // *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1998. Vol. 49. P. 345–370.
- Koornneef M., Hanhart C. J., van der Veen J. H. A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Gen. Genet.* 1991. N 229. P. 57–66.
- Kuittinen H., Sillanpaa M. J., Savolainen O. Genetic basis of adaptation: flowering time in *Arabidopsis thaliana* // *Theor. Appl. Genet.* 1997. Vol. 95. P. 573–583.
- Law J. A., Jacobsen S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals // *Nat Rev Genet.* 2010. Vol. 11, N 3. P. 204–220.
- Lenz T. L., Eizaguirre C., Rotter B., Kalbe M., Milinski M. Exploring local immunological adaptation of two stickleback ecotypes by experimental infection and transcriptome-wide digital gene expression analysis // *Molecular Ecology*. 2013. Vol. 22, N 3. P. 774–786.
- Lindsay S., Bird A. P. Use of restriction enzymes to detect potential gene sequences in mammalian DNA // *Nature*. 1987. Vol. 327. P. 336–338.
- Lynch M. The frailty of adaptive hypotheses for the origins of organismal complexity // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2007. Vol. 104. P. 8597–8604.
- Liang P., Pardee A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction // *Science*. 1992. Vol. 257, N 5072. P. 967–971.
- Lippman Z., Gendrel A. V., Black M., Vaughn M. W., Dedhia N., McCombie W. R., Lavine K., Mittal V., May B., Kasschau K. D. et al. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control // *Nature*. 2004. Vol. 430. P. 471–476.
- Lippman Z., Gendrel A. V., Colot V., Martienssen R. Profiling DNA methylation patterns using genomic tiling microarrays // *Nat. Methods*. 2005. Vol. 2. P. 219–224.
- Madlung A., Comai L. The Effect of Stress on Genome Regulation and Structure // *Annals of Botany*. 2004. Vol. 94. P. 481–495.

- Mather E. L., Perry R. P. Methylation status and DNase I sensitivity of immunoglobulin genes: changes associated with rearrangement // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983. Vol. 80. P. 4689–4693.
- Matsumura H., Ito A., Saitoh H. et al. SuperSAGE // *Cellular Microbiology*. 2005. Vol. 7. P. 11–18.
- McArthur M., Gerum S., Stamatoyannopoulos G. Quantification of DNaseI-sensitivity by real-time PCR: quantitative analysis of DNaseI-hypersensitivity of the mouse beta-globin LCR // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 313. P. 27–34.
- McGregor A. P., Orgogozo V., Delon I., Zanet J., Srinivagan D. G., Payre F., Stern D. L. Morphological evolution through multiple cis-regulatory mutations at a single gene // *Nature*. 2007. Vol. 448. P. 587–590.
- Momparler R., Bovenzi V. DNA Methylation and Cancer // *Journal of Cellular Physiology*. 2000. Vol. 183. P. 145–154.
- Oleksiak M. F., Churchill G. A., Crawford D. L. Variation in gene expression within and among natural populations // *Nat Genet.* 2002. Vol. 32, N 2. P. 261–266.
- Orzack S. H., Sober E. How (not) to test an optimality model // *Trends Ecol. Evol.* 1994. Vol. 9, N 7. P. 265–267.
- Pavlidis P., Hutter S., Stephan W. A population genomic approach to map recent positive selection in model species // *Molecular Ecology*. 2008. Vol. 17. P. 3585–3598.
- Pigliucci M. Ecological and evolutionary genetics of *Arabidopsis* // *TREE*. 1998. N 3. P. 485–489.
- Place A. R., Powers D. A. Kinetic characterization of the lactate dehydrogenase (LDH-B4) allozymes of *Fundulus heteroclitus* // *Journal of Biological Chemistry*. 1984. Vol. 259. P. 1309–1318.
- Pfeifer G. P., Riggs A. D. Chromatin differences between active and inactive X chromosomes revealed by genomic footprinting of permeabilized cells using DNase I and ligation-mediated PCR // *Genes Dev.* 1991. Vol. 5. P. 1102–1113.
- Powers D. A., Place A. R. Biochemical genetics of *Fundulus heteroclitus*: temporal and spatial variation in gene frequencies of LDH-B, MDH-A, GPI-B, and PGM-A // *Biochemical Genetics*. 1978. Vol. 16. P. 593–607.
- Powers D. A., Schulte P. M. Evolutionary adaptations of gene structure and expression in natural populations in relation to a changing environment: a multidisciplinary approach to address the million-year saga of a small fish // *Journal of Experimental Zoology*. 1998. Vol. 282. P. 71–94.
- Rollins R. A., Haghighi F., Edwards J. R., Das R., Zhang M. Q., Ju J., Bestor T. H. Large-scale structure of genomic methylation patterns // *Genome Res.* 2006. Vol. 16. P. 157–163.
- Sabo P. J., Kuehn M. S., Thurman R., Johnson B. E., Johnson E. M., Cao H., Yu M., Rosenzweig E., Goldy J., Haydock A. et al. Genome-scale mapping of DNase I sensitivity in vivo using tiling DNA microarrays // *Nat Methods*. 2006. Vol. 3. P. 511–518.
- Salome P. A., Bomblies K., Laitinen R. A. E., Yant L., Mott R., Weigel D. Genetic architecture of flowering-time variation in *Arabidopsis thaliana* // *Genetics*. 2011. Vol. 188. P. 421–433.
- Schluter D. *The Ecology of Adaptive Radiation*. Oxford University Press, Oxford. 2000 p.
- Schulte P. M., Glemet H. C., Fiebig A. A., Powers D. A. Adaptive variation in lactate dehydrogenase-B gene expression: role of a stress-responsive regulatory element // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2000. Vol. 97. P. 6597–6602.
- Schulte P. M., GomezChiarri M., Powers D. A. Structural and functional differences in the promoter and 5' flanking region of Ldh-B within and between populations of the teleost *Fundulus heteroclitus* // *Genetics*. 1997. Vol. 145. P. 759–769.
- Schumacher A., Kapranov P., Kaminsky Z., Flanagan J., Assadzadeh A., Yau P., Virtanen C., Winegarden N., Cheng J., Gingeras T. et al. Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34. P. 528–542.
- Shu H., Grissem W., Hennig L. Measuring *Arabidopsis* chromatin accessibility using DNase I-polymerase chain reaction and DNase I-Chip assays // *Plant Physiology*. 2013. Vol. 164, N 4. P. 1794–1781.
- Soong T. W., Venkatesh B. Adaptive evolution of tetrodotoxin resistance in animals // *Trends in Genetics*. 2006. Vol. 22. P. 621–626.
- Soppe W. J., Jacobsen S. E., Alonso-Blanco C., Jackson J. P., Kakutani T., Koornneef M., Peeters A. J. The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene // *Mol. Cell*. 2000. Vol. 6. P. 791–802.
- Stinchcombe J. R., Weinig C., Ungerer M. et al. A latitudinal cline in flowering time in *Arabidopsis thaliana* modulated by the flowering time gene *FRIGIDA* // *PNAS*. 2004. Vol. 101, N 13. P. 4712–4717.
- Su J., Yan H., Wei Y., Liu H., Liu H., Wang F., Lv J., Wu Q., Zhang Y. CpG_MPs: identification of CpG methylation patterns of genomic regions from high-throughput bisulfite sequencing data // *Nucleic Acids Research*. 2013. Vol. 41, N 1. P. 1–15.
- Symonides E. Population dynamics of annual plants // Davy A. J., Hutchings M. J., Watkinson A. R. (Eds.). 28th Symposium of the British Ecological Society, Sussex: Blackwell, 1987. P. 221–248.
- Velculescu V. E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K. W. Serial analysis of gene expression // *Science*. 1995. Vol. 270, N 5235. P. 484–487.
- Waddington C. M. *The Evolution of an Evolutionist*. Edinburgh: Edinburgh Univ. Press, 1975. 328 p.
- Wang X., Simpson R. T. Chromatin structure mapping in *Saccharomyces cerevisiae* in vivo with DNase I // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29. P. 1943–1950.
- Watt W. B., Wheat C. W., Meyer E. H., Martin J. F. Adaptation at specific loci. VII. Natural selection, dispersal and the diversity of molecular-functional variation patterns among butterfly species complexes (*Colias*: Lepidoptera, Pieridae) // *Molecular Ecology*. 2003. Vol. 12. P. 1265–1275.
- Weil M. R., Widlak P., Minna J. D., Garner H. R. Global survey of chromatin accessibility using DNA microarrays // *Genome Res.* 2004. Vol. 14. P. 1374–1381.
- Weber M., Hellmann I., Stadler M. B., Ramos L., Pääbo S., Rebhan M., Schübeler D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome // *Nat. Genet.* 2007. Vol. 39. P. 457–466.

Wheat C. W., Watt W. B., Pollock D. D., Schulte P. M. From DNA to fitness differences: sequences and structures of adaptive variants of *Colias* phosphoglucose isomerase (PGI) // *Molecular Biology and Evolution*. 2006. Vol. 23. P. 499–512.

Whitehead A., Crawford D. L. Neutral and adaptive variation in gene expression // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2006. Vol. 103. P. 5425–5430.

Zhang X., Yazaki J., Sundaresan A., Cokus S., Chan S. W., Chen H., Henderson I. R., Shinn P.,

Pellegrini M., Jacobsen S. E. et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis* // *Cell*. 2006. Vol. 126. P. 1189–1201.

Zilberman D., Gehring M., Tran R. K., Ballinger T., Henikoff S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription // *Nat. Genet.* 2007. Vol. 39. P. 61–69.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Топчиева Людмила Владимировна

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: topchieva67@mail.ru
тел.: (8142) 769810

Федоренко Ольга Михайловна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: fedorenko_om@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Topchieva, Lyudmila

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: topchieva67@mail.ru
tel.: (8142) 769810

Fedorenko, Olga

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: fedorenko_om@mail.ru
tel.: (8142) 573107

УДК 577.125:597.553.2:591.3

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ ЛИПИДОВ В РАННЕМ РАЗВИТИИ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ *SALMO SALAR* L.

Н. Н. Немова, З. А. Нефедова, С. А. Мурзина

Институт биологии Карельского научного центра РАН

На основе обзора собственных и литературных данных показана важная и незаменимая роль липидов в процессе онтогенеза лосося, особенно на ранних стадиях развития, когда развивающаяся икринка представляет собой закрытую систему, периодически обменивающуюся компонентами метаболизма со средой. При этом липиды используются и как важные структурные элементы для построения новых тканей личинки, и для ее энергетических нужд. Установлено, что уровень и характер распределения липидов в икре и личинках являются важными показателями жизнеспособности потомства, они обеспечивают включение адаптационных биохимических механизмов в изменяющихся условиях среды.

К л ю ч е в ы е с л о в а: атлантический лосось, раннее развитие, липиды, жирные кислоты, Северо-Запад России.

N. N. Nemova, Z. A. Nefyodova, S. A. Murzina. LIPID PATTERNS EARLY IN ATLANTIC SALMON, *SALMO SALAR* L., ONTOGENY

A review of the authors' own and published data proves lipids play an essential and critical role throughout salmon ontogeny, especially at its early stages, when an embryo is a closed system, occasionally exchanging the products of its metabolism with the environment. Lipids are both important structural components in building up larval tissues and utilized for its energy needs. It was shown that the level and the distribution of lipids in eggs and larvae are important indicators of the offspring viability, they ensure the activation of biochemical adaptation mechanisms in a changing environment.

K e y w o r d s: Atlantic salmon, early development, lipids, fatty acids, North-West Russia.

Введение

Известно, что популяционный фонд атлантического лосося России представляет существенную часть мировых запасов вида, а его пресноводная форма сосредоточена главным образом в Карелии [Kazakov, Veselov, 1998]. В северо-западных водоемах России проходная форма атлантического лосося называется сем-

гой. Особенность лососевых рыб Европейского Севера заключается в длительном периоде речного развития – от 2 до 6 лет и в образовании в зависимости от экологических условий фенотипических групп. Жизненный цикл лососевых рыб включает необычайно интересные и разнообразные этапы развития со сложной системой адаптаций. Период онтогенеза лососевых рыб, проходящий в речных условиях,

характеризуется существенными морфологическими и функциональными преобразованиями, которые сопровождаются кардинальными перестройками клеточного метаболизма, изменением регуляции скоростей и взаимодействием различных путей обмена. Это способствует формированию фенотипических групп, лабильной стратегии поведения и выживания в подвижной среде обитания [Veselov et al., 1998; Веселов, Калюжин, 2001; Павлов и др., 2010]. В целом дифференциацию смолтов из одной генерации по возрасту следует рассматривать как один из механизмов формирования в крупных нерестовых реках сложной возрастной структуры популяций (по сочетанию количества прожитых лет в реке и море) [Зубченко и др., 2002]. Однако предпосылки дифференциации смолтов наблюдаются намного раньше – на стадии эмбрионального развития и последующего расселения личинок и мальков лосося, когда в разных микробиотопах по условиям обитания возникают фенотипические группы. Изучение эколого-биохимических механизмов созревания и развития этих рыб наряду со значением для выявления особенностей развития вида представляет несомненный интерес для решения общих проблем биологии индивидуального развития организмов.

Липидный статус, как один из интегральных показателей уровня обмена веществ, может служить биохимическим индикатором состояния организма рыб и отражать процессы внутрипопуляционной дифференцировки и развития. Одним из основных биохимических критериев зрелости икры и готовности ее к оплодотворению является содержание в ней липидов, в том числе жирных кислот, а уровень и соотношение отдельных липидных фракций и ЖК являются показателями жизнеспособности потомства [Крыжановский, 1960; Tocher, 2003]. У молоди лососевых (Salmonidae), как и у ряда других рыб, существует дифференциация на группы по морфологическим и физиолого-биохимическим показателям [Павлов и др., 2007, 2008, 2010, 2012]. Одна из предпосылок образования групп, по-видимому, связана с изначальной разнокачественностью икры по биохимическим показателям, например, по липидному статусу [Нефедова и др., 2010]. Известно также, что икринки лососевых рыб, и в частности атлантического лосося, отличаются друг от друга по размерам, массе и объему запасенных веществ, таких как ТАГ, и в том числе соотношением концентраций ключевых в метаболическом отношении ЖК – пальмитиновой, олеиновой, линолевой, линоленовой [Сидоров и др., 1996]. Эта разнокачественность икры

в последующем сказывается на интенсивности роста и развитии ранней молоди. Она влияет и на результаты первичного расселения сеголеток атлантического лосося из нерестовых гнезд [Веселов, Калюжин, 2001].

1. Роль липидов в процессе созревания яйца. Содержание липидов в зрелых яйцах лососевых и их значение для развития эмбриона и личинки

Среди костистых рыб лососевые обладают одними из наиболее богатых по количеству липидов яйцами. У разных видов лососевых рыб икра к моменту оплодотворения содержит 12–30 % липидов от сухой массы, или 2,0–16,0 % от сырой массы [Крыжановский, 1960; Лизенко, 1980; Сидоров, 1983; Нефедова, 1989]. Яйца медленно развивающихся видов (в их числе лососевые) содержат много липидов, тогда как у быстро развивающихся видов их содержание меньше [Лапин, Мацук, 1979; Kaitaranta, Ackman, 1981; Нефедова, 1994]. Высокое содержание липидов в икре лососевых рыб ряд исследователей объясняют экологическими причинами, в результате которых в процессе эволюции они приобрели адаптивное значение [Крыжановский, 1960; Сидоров, 1983; Нефедова, 1989]. Длительный инкубационный период, продолжающийся для многих лососевых 6–7 месяцев (с октября по апрель), и недостаток кормовых объектов в период перехода лососевых личинок к активному питанию, по-видимому, благоприятствовали выработке у них в процессе эволюции способности накапливать такие богатые энергией вещества, как липиды [Сидоров, 1983]. Кроме того, личинки могут находиться без экзогенной пищи несколько суток, что повышает их выживаемость в довольно суровых условиях. К началу нереста основная масса всех необходимых для роста и развития зародыша веществ сосредоточена в виде желточных включений.

Желток составляет свыше 98 % объема яиц лососевых, а цитоплазма образует лишь тонкий слой у поверхности клетки, утолщающийся у анимального полюса, где находится клеточное ядро. Степень накопления желтка в процессе вителлогенеза имеет важное значение для последующего развития, так как он является единственным источником энергетических и структурных субстратов для роста зародышей до перехода их на внешнее питание. Желток представляет собой сложную смесь соединений различной природы: фосфопротеидов, липопротеидов, гликопротеидов, гликогена, фосфолипидов, жирных кислот, триглицеридов и

др.; часть его компонентов имеет эндогенное происхождение, а другая часть – экзогенное. Желток лососевых имеет жидкую консистенцию и содержит жировую каплю [Озернюк, 1985]. Липиды в составе желтка находятся в связанной с протеинами форме в виде жировых капель и желточных глобул. Содержание триацилглицеринов в жировых каплях лосося наиболее высоко и составляет 94,5 %, затем следуют свободные жирные кислоты, эфиры холестерина и моноглицериды и свободный холестерин, в незначительных количествах встречаются гликолипиды [Нефедова, 1989; Jalabert, 2005; Johnson, 2009]. Жировые капли – источник энергетических веществ в критические периоды, например, когда задерживается выклев личинки, но прежде всего они выполняют гидростатическую функцию, что позволяет эмбрионам и личинкам изменять ориентацию своего тела в течение развития [Каева, 1983; Nissling, Westin, 1991]. Для метаболических процессов жировые капли начинают расходоваться на более поздних стадиях развития эмбриона. В желточных глобулах высоко содержание фосфолипидов – 56,5 % (от общей суммы липидов). Основную часть липидов яиц лососевых рыб, а также других яйцекладущих животных – земноводных, иглокожих, пресмыкающихся и птиц – составляют фосфолипиды и триацилглицерины, доля холестерина и эфиров холестерина несколько ниже [Kozhina et al., 1978; Шатуновский, 1980; Ryusaki, 1981].

Таким образом, созревшие, но еще не оплодотворенные яйца представляют собой специализированные клетки для осуществления дальнейшего развития. Как правило, строение и состав зрелого яйца отражает потребности будущего эмбриона, которые определяются в первую очередь экологическими особенностями развития икры.

1.1. Содержание фосфолипидов в икре атлантического лосося

Преднерестовая икра лососевых рыб (лосось, радужная форель) содержит от 32 до 57 % фосфолипидов от общих липидов [Лизенко и др., 1980]. Преобладание фосфолипидов отмечается и для молок, концентрация их колеблется от 69 до 93 %. В молоках они выполняют не только структурную роль, но и энергетическую, используются для движения сперматозоидов, а также – стабилизирующую, предохраняя сперматозоиды от разрушения при движении их в холодной воде [Лизенко и др., 1983; Нефедова, 1994; Юровицкий и др., 1996].

Основную массу фосфолипидов в икре рыб составляет фосфатидилхолин (ФХ) – от 46 до 80 % от суммы фосфолипидов [Лизенко и др.,

1980, 1983]. ФХ известен как наиболее распространенный липид, преобладающий не только в целых органах и тканях, но и в субклеточных структурах; он является главным компонентом в яйцах рыб и других животных. Значительное количество ФХ связано со специфическим белком яиц – липовителлином, который под действием половых гормонов синтезируется в печени, транспортируется кровью в ооциты и откладывается в них в составе желтка, в небольших количествах он синтезируется в самих ооцитах. Липовителлин представляет собой основное резервное вещество яйца, обеспечивающее эмбрионы энергетическими и структурными веществами в процессе эмбрионального и личиночного развития [Лизенко и др., 1983; Нефедова, 1989].

Фосфатидилэтаноламин (ФЭА) – второй важный компонент биомембран и второй после ФХ по количественному содержанию в яйцах рыб и других животных. В соединении с белками они создают основной каркас биологических мембран, где распространены более или менее равномерно [Кольман, Рем, 2000]. В зрелых яйцах лосося он составляет до 25 % от общих липидов, в молоках его содержание колеблется от 28 до 30 % [Лизенко и др., 1983].

Минорные фосфолипиды – сфингомиелин (СФМ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозитол (ФИ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), кардиолипин и фосфатидная кислота – в яйце находятся в незначительных количествах, но в сумме могут составлять до 20 %. Такое содержание может иметь определенное адаптивное значение, связанное с экологическими и физиологическими особенностями жизни лосося и других рыб.

Лизофосфатидилхолин (ЛФХ) – продукт метаболизма фосфатидилхолина, основного компонента фосфолипидов большинства клеточных биомембран. В малых количествах он выступает как активатор, в больших – как ингибитор ферментативных реакций, оказывая сильное гемолитическое действие [Антонов, 1982]. Накопление лизофосфатидилхолина повышает проницаемость биомембран для ионов и молекул [Грибанов, 1991; Осадчая и др., 2004], что отмечалось в зрелой икре перед оплодотворением [Сидоров, 1983]. Физиологическое значение повышения уровня ЛФХ в мышечных тканях связывают с его влиянием на сократительную и расслабляющую функцию мускулатуры [Проказова и др., 1998].

Сфингомиелин (СФМ) и кардиолипин количественно преобладают в молоках исследуемых рыб. Зрелые спермии рыб в средней своей части содержат крупные митохондрии, по-

этому кардиолипид (специфический липид митохондрий) обнаруживается в половых продуктах самцов в большей концентрации, чем в яйцах. Содержание СФМ в молоках лосося составляет до 17 % от суммы фосфолипидов, тогда как у самок в икре – до 8 %, кардиолипид в молоках – до 12 %, а в икре 2–3 % от суммы фосфолипидов, ЛФХ в икре лосося составляет 3 % от суммы фосфолипидов [Лизенко и др., 1983; Сидоров, 1983].

Фосфатидилсерин является минорным фосфолипидом как в зрелой икре рыб перед нерестом, так и в процессе эмбрионального развития. Накопление этого ненасыщенного фосфолипида индуцирует активность мембранных ферментов, например комплекс Na/K-АТФазы, связанный с осморегуляцией, что имеет значение при смене среды обитания рыб [Schuurmans Stekhoven, Bonting, 1981; Болдырев и др., 2006].

1.2. Роль холестерина в половых гаметах атлантического лосося

Холестерин – один из важнейших липидов мембран наряду с фосфолипидами и гликолипидами. Присутствие холестерина в клеточных мембранах регулирует не только морфологическую стабильность, но и проницаемость мембран по отношению к растворимым веществам за счет своей возможности переходить с одной стороны мембраны на другую [Кольман, Рем, 2000], а также устраняет ингибирующее влияние образующихся в мембране гидроперекисей [Финагин, 1980]. Кроме того, холестерин является метаболическим предшественником желчных кислот и стероидных гормонов. Известно, что холестерин и другие липиды являются одними из основных соединений для стероидогенеза в семенниках и яичниках [Лопухин и др., 1985]. Холестерин синтезируется из ацетил-КоА гепатоцитами печени и клетками эпителия кишечника, в то время как остальные клетки получают его из крови. Холестерин и его эфиры транспортируются с током крови в форме комплексов – липопротеинов. Такое многообразие функций холестерина делает его важным компонентом для развивающихся организмов. Содержание его в липидах икры сильно варьирует – 0,6–38,0 % от общих липидов – как у разных видов в одном водоеме, так и у одних и тех же в разных водоемах. В икре атлантического лосося содержание холестерина составляет 4,3 %, наименьшее содержание – в икре окуня и налима – 0,6–0,7 %, относительно большое содержание отмечалось в преднерестовой икре атлантической сельди – 8,6 % от общих липидов [Лизенко и др., 1983; Tocher et al., 1985; Tocher, 2003],

а у сайды – до 38 % [Сторожук, 1980]. Содержание холестерина в ткани созревающих семенников рыб увеличивается под влиянием гонадотропинов. У производителей атлантического лосося холестерин наряду с ФЛ составляет одну из основных фракций липидов зрелых гонад. Большая вариабельность холестерина в зрелых яичниках разных видов рыб связана, по всей вероятности, не только с физиолого-биохимическими особенностями, но и с условиями их обитания.

1.3. Триацилглицерины и эфиры холестерина – запасные липиды яиц

Триацилглицерины (ТАГ) и эфиры холестерина (ЭХС) – это одна из основных форм запасных веществ в организме, в том числе в икре [Сидоров, 1983]. В состав молекулы ЭХС входят холестерин и жирная кислота, которые могут быть использованы клеткой при многих метаболических процессах. При гидролизе этой группы липидов, например в процессе развития зародыша, освобождаются жирные кислоты, которые могут быть утилизированы зародышем для энергетических нужд или при биосинтезе собственных липидов, тогда как холестерин может служить источником стероидных гормонов и желчных кислот, а также компонентом для построения биомембран [Мурзина и др., 2009]. В соотношении двух основных липидных фракций (ФЛ и ТАГ) прослеживается четкая закономерность: чем больше в липидах икры содержится ФЛ, тем меньше в них сосредоточено ТАГ. Содержание запасных липидов в икре сильно зависит от экологических факторов: наиболее высокая концентрация их у рыб, инкубационный период икры которых более 6 месяцев, и наоборот, икра с небольшим инкубационным периодом содержит мало ТАГ и ЭХС [Лизенко и др., 1983].

Анализ работ по исследованию содержания разных групп липидов в преднерестовой икре некоторых видов рыб показывает, что икра лососевых рыб, как правило, содержит относительно большое количество ТАГ – от 40 до 65 % от общих липидов, приблизительно равное таковому ФЛ. Содержание ТАГ в икре атлантического лосося составляет около 24–27 %, а ЭХС – до 7 % от общих липидов [Лизенко и др., 1983; Сидоров, 1983; Нефедова, 1989; Мурзина и др., 2009, 2012]. Следует отметить, что в отличие от икры в половых продуктах самцов значительно снижена концентрация запасных липидов – ТАГ и ЭХС, но увеличено содержание мембранных фосфолипидов, составляющих в сумме от 80 до 90 % [Нефедова и др., 1994; Мурзина и др., 2009, 2012].

2. Динамика содержания липидов в процессе раннего развития рыб

2.1. Динамика общих липидов на начальных этапах эмбрионального развития

Все обменные процессы в развивающемся организме взаимосвязаны и направлены на оптимизацию и адаптацию роста и развития организма. Использование лососем в качестве основных источников энергии углеводов, а затем жиров имеет глубокий экологический смысл. Развитие икры лососевых происходит в грунте, где условия водообмена и газообмена значительно хуже, чем у представителей других экологических групп. Получение энергии за счет белков могло бы в некоторой степени вызвать ухудшение условий водоснабжения, дефицита кислорода вследствие токсичности метаболитов белкового обмена и в конечном итоге привести к гибели икры. Использование углеводов и жиров в качестве источников энергии позволяет избежать загрязнения воды большим количеством отходов, поскольку конечными продуктами окисления являются вода и углекислый газ.

В начальный период эмбрионального развития у разных видов рыб уменьшение суммарных липидов происходило за счет изменения уровня триацилглицеринов, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, свободных жирных кислот, холестерина и его эфиров [Гойда и др., 1975; Нефедова, 1989; Мурзина и др., 2009, 2012]. В работах, выполненных на лососе, было показано, что содержание общих липидов после оплодотворения остается стабильным, содержание фосфолипидов через два часа после оплодотворения уменьшалось за счет ФХ, а доля ТАГ повышалась; такие же изменения отмечены и для икры атлантической сельди и радужной форели [Takama et al., 1969; Tocher et al., 1985]. Снижение уровня ФХ (в процентах от сухой массы) на начальных этапах эмбрионального развития атлантической сельди коррелировало с подъемом содержания другого мембранного липида – ФЭА, хотя эти изменения не адекватны по величине [Tocher et al., 1985]. У выюна, например, в начальный период эмбриогенеза отмечены противоположные изменения липидных фракций: доля фосфолипидов увеличивалась, а триацилглицеринов – уменьшилась [Takama et al., 1969; Гойда и др., 1975]. По всей вероятности, происходящее снижение содержания липидов на этапе дробления можно связать с использованием их как структурных компонентов (в основном фосфолипидов) для образования новых мембран дифференцированных клеток (при этом в результате их модификации часть запасенных

в желтке фосфолипидов уменьшается) и как энергетических веществ (главным образом триацилглицеринов и свободных жирных кислот) [Нефедова, 1989; Мурзина и др., 2009].

2.2. Динамика общих липидов и их классов от стадии органогенеза до выклева личинки

В период от стадии органогенеза до выклева в икринке происходят структурно-морфологические изменения, которые влияют на обменные процессы и реакции организма. На этих стадиях наблюдается дифференцировка отделов головного мозга, зачатков глазных пузырей, образование подкишечно-желточной системы кровообращения, формирование плавников, видна пульсация сердца, развитие печечно-желточной системы кровообращения и ее функционирование, оформление органов дыхания и ряд других преобразований. Результатом этих изменений является образование малой личинки и дальнейшая ее подготовка к вылуплению. К моменту выклева абсолютное содержание жира и белка в икре незначительно уменьшается. Анализ качественного состава липидов показал, что в это время происходит уменьшение абсолютного содержания глицеридов, холестерина и увеличение фосфолипидов [Мурзина и др., 2009, 2012].

В некоторых работах [Tocher et al., 1985, 2003] показано, что при развитии от органогенеза до выклева личинок лосося и других костистых рыб общее содержание липидов мало изменяется или чуть снижается по сравнению с содержанием в зрелой икре до оплодотворения, однако авторы других работ [Сидоров, 1983; Cowey et al., 1985] отмечают постепенное уменьшение общего содержания липидов до выклева личинок (в процентах от сырой и сухой массы), что связано со снижением уровня ФХ, который находится в своеобразной запасной форме липовителлина в желтке. В результате гидролиза ФХ развивающийся организм может получать жирные кислоты (для энергетического обмена и новообразования структурных липидов), неорганический фосфат (для промежуточного обмена, включающего синтез нуклеиновых кислот), холин (для образования новых фосфолипидов и как источник метильных групп) [Нефедова, 1989; Кольман, Рем, 2000].

К концу эмбрионального развития уровень ТАГ остается тем же и сохраняется в желточном мешке до стадии выклева, после чего они становятся важным источником энергии до перехода личинки на внешнее питание, обеспечивая после выклева ее жизнедеятельность [Tocher et al., 1985; Мурзина и др., 2009].

Таким образом, для атлантического лосося в период развития от этапа органогенеза и до выклева личинки характерно снижение уровня ФХ при сохранении содержания запасных ТАГ почти на одном уровне.

2.3. Выклев личинки и связанные с ним изменения уровня липидов до перехода на смешанное питание

В ходе эмбрионального развития лосося происходит уменьшение массы желтка. На этапе гаструляции масса желтка составляет более 80 % от его массы на стадии дробления. На последующих этапах развития наблюдается увеличение скорости утилизации желтка. На этапе пигментации глаз масса желтка составляла 15,8 % от его массы на этапе хвостовой почки, а у 4-суточной личинки – 16,3 % от его массы на стадии пигментации глаз. За это время в желтке происходило непрерывное снижение содержания общих липидов: от 6,5–7,3 мг на этапе дробления до 3,7–4,3 мг у 4-суточной личинки в расчете на одно яйцо, один организм [Юровицкий и др., 1996]. Наши ранние исследования показали, что в процессе эмбрионально-личиночного развития лосося в желтке наблюдались изменения в уровне липидов. Так, от стадии дробления до 4-суточной личинки содержание ФЛ, являющихся основным материалом для синтеза биомембран, снижалось в 1,6 раза, а уровень ТАГ, обеспечивающих энергетику развивающегося организма, уменьшался в 2,6 раза [Сидоров и др., 1996].

У разных видов рыб утилизация отдельных классов липидов протекает с неодинаковой скоростью: у лосося эта скорость постоянна. Жировые капли желточного мешка лосося на стадии дробления на 94,6 % состояли из ТАГ. В ходе эмбрионально-личиночного развития происходило существенное снижение доли этой липидной фракции. У 4-суточной личинки она составляла 62 % от ее уровня на этапе дробления. Более половины содержимого жировой капли желточного мешка сохраняется до поздних стадий личиночного развития, выполняя в том числе и гидростатическую функцию вплоть до появления плавательного пузыря [Нефедова, 1989; Сидоров и др., 1996].

Установлена определенная динамика липидов в желтке и теле развивающейся личинки лосося. В первый день после выклева отмечается относительно высокий уровень ЛФХ и свободных жирных кислот в липидах желточного мешка (9,3 и 21,2 %) по сравнению с личинкой (тело), где их содержание в три раза ниже, что можно связать с усилением деградации ТАГ и ФХ в этот период [Нефедова, 1989; Tocher et al., 1985].

На 4-й день после выклева у личинок атлантического лосося наблюдалось снижение в желточном мешке содержания ФХ, холестерина и повышение их содержания в теле личинки, в то время как уровень ТАГ в желтке повышался [Нефедова, 1989]. Эти изменения можно объяснить, во-первых, тем, что личинка в этот период начинает использовать ТАГ, синтезированные *de novo* печенью, которая к этому времени уже функционирует, во-вторых, повышение содержания ТАГ может быть связано с усилением использования личинкой других компонентов желтка в данный период, например белка [Нефедова, 1989].

Переход личинок лосося на внешнее питание начинается в то время, когда остаток желточного мешка составляет 17–20 % от исходного; выйдя из бугра, личинки начинают активно питаться. Количество и качество корма сильно влияет на скорость резорбции желточного мешка. При активном питании личинок происходит быстрая резорбция желтка, причем остаток его трансформируется в жир и откладывается в виде тяжей вдоль кишечника. При недостатке корма или при голодании резорбция желтка происходит медленно, рост задерживается [Крыжановский, 1960]. Молодь лососевых питается в основном организмами бентоса и «воздушным кормом», который зачастую играет очень большую роль в питании [Смирнов, 1979; Шустов, 1983, 1995].

Таким образом, собственные и литературные данные свидетельствуют о важной и незаменимой роли липидов в процессе развития лосося, особенно на ранних стадиях, когда развивающаяся икринка представляет собой закрытую систему, периодически обменивающуюся компонентами метаболизма со средой. При этом липиды используются и как важные структурные элементы для построения новых тканей личинки, и для ее энергетических нужд.

Заключение

Наши результаты и данные литературы свидетельствуют о высоком стабильном уровне общих липидов в икре атлантического лосося, независимо от стадии эмбрионального развития, что подтверждает большую функциональную значимость липидов для зародыша и существование генетических механизмов, регулирующих их содержание. Установлено, что в развивающейся икре лосося наиболее вариабельной составляющей являются запасные липиды – триацилглицерины. Сохранение их содержания к моменту выклева необходимо для выживания личинки после выклева при ограниченном питании в течение

некоторого времени до перехода на активное питание. Основные изменения индивидуальных фосфолипидов установлены на стадиях органогенеза, пигментации глаз и перед выклевом предличинки. Модификации фосфолипидных спектров направлены на снижение вязкости биомембран, изменение активности мембраносвязанных ферментов, связаны с подготовкой личинок к выклеву. Развивающаяся икринка в процессе эмбриогенеза постоянно обменивается продуктами метаболизма с окружающей средой, поэтому необходимая степень вязкости биомембран регулируется и изменением липидного спектра. Результаты исследований роли липидов в процессе раннего развития пресноводного лосося *Salmo salar* L. свидетельствуют о том, что уровень и характер распределения липидов в развивающейся икре является важным показателем жизнеспособности потомства, они обеспечивают включение адаптационных биохимических механизмов в изменяющихся условиях среды. Данные об особенностях расходования и трансформации липидов в эмбриогенезе *Salmo salar* L. могут служить основой для понимания их функциональной роли в развитии организма при оценке качества икры.

Остаются неисследованными вопросы о связи метаболических изменений (в том числе и на уровне липидного обмена) у лососевых рыб, рост и развитие которых происходит в условиях высоких широт, в сочетании с комплексом территориальных, физических и климатических факторов среды, с механизмами формирования их возрастной и субпопуляционной структуры. Для этого необходимо проведение комплексных исследований с использованием методов ихтиологии, гидробиологии, морфологии, биохимии, физиологии, молекулярной биологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 14-24-00102.

Литература

- Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. М.: Наука, 1982. 150 с.
- Болдырев А. А., Кяйвярайнен Е. И., Илюха В. А. Биомембранология. Петрозаводск, 2006. 225 с.
- Веселов А. Е., Калюжин С. М. Экология, поведение и распределение молоди атлантического лосося. Петрозаводск: Карелия, 2001. 160 с.
- Гойда О. А., Кусень С. Й., Мукалов И. О. Исследование фосфолипидов в эмбриогенезе вьюна (*Misgurnus fossilis* (L.)) // Укр. биохим. журн. 1975. Т. 47. С. 370–373.
- Грибанов Г. А. Особенности структуры и биологическая роль лизофосфолипидов // Вопр. мед. химии. 1991. Т. 37, № 4. С. 2–16.
- Зубченко А. В., Веселов А. Е., Калюжин С. М. Биологические основы управления запасами семги в реке Варзуге и Варзугском рыбопромысловом районе // Практические рекомендации. 2002. УОП ООО «Остленд». Петрозаводск; Мурманск. 77 с.
- Каева В. Е. Положение жировой капли в желточных мешках как показатель пространственной ориентации молоди горбуши // В кн.: Марикультура на Дальнем Востоке. Владивосток, 1983. С. 85–88.
- Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия / Ред. Я. Кольман, К.-Г. Рем. М.: Мир, 2000. 469 с.
- Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов / Ред. Е. М. Крепс. Л.: Наука, 1981. 339 с.
- Крыжановский С. Г. О значении жировых отложений в яйцах рыб // Зоол. журн. 1960. Т. 39. С. 111–123.
- Лапин В. И., Мацук В. Е. Утилизация желтка и изменение биохимического состава икры наваги *Eleginus navaga* (Pall) в процессе развития // Вопр. ихтиологии. 1979. Т. 19. С. 341–346.
- Лизенко Е. И., Нефедова З. А., Титова В. Ф., Стерлигова О. П. Липидный состав и биологическая роль различных липидов в икре и молоках пресноводных рыб // Сравнительная биохимия водных животных. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1983. С. 28–42.
- Лизенко Е. И., Сидоров В. С., Нефедова З. А. Экологическая характеристика липидного состава икры некоторых видов рыб // Биохимия пресноводных рыб Карелии. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1980. С. 6–15.
- Лопухин Ю. М., Арчаков А. И., Владимиров Ю. А., Коган Э. М. Холестериноз. М.: Медицина, 1985. 350 с.
- Мурзина С. А., Нефедова З. А., Руоколайнен Т. Р., Васильева О. Б., Немова Н. Н. Динамика содержания липидов в процессе раннего развития пресноводного лосося *Salmo salar* L. // Онтогенез. 2009. Т. 40, № 3. С. 208–214.
- Мурзина С. А., Нефедова З. А., Рипатти П. О., Немова Н. Н. Динамика жирнокислотного состава липидов в процессе эмбрионального развития атлантического лосося *Salmo salar* L. // Онтогенез. 2012. Т. 43, № 2. С. 154–160.
- Нефедова З. А. Липидный статус лосося на ранних этапах онтогенеза // Автореф. дис. Харьков, 1989. 16 с.
- Нефедова З. А. Эколого-физиологическое значение липидов в процессе раннего онтогенеза рыб // Теоретические аспекты экологической биохимии. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1994. С. 55–73.
- Нефедова З. А., Сидоров В. С., Юровицкий Ю. Г. Липидный состав зрелых яиц костистых рыб // Онтогенез. 1994. Т. 25. С. 53–59.
- Нефедова З. А., Мурзина С. А., Руоколайнен Т. Р., Рипатти П. О., Немова Н. Н. Липидный состав разных порций текущей икры атлантического лосося *Salmo salar* L. // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Т.1. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2010. С. 215–218.

Озернюк Н. Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. М.: Наука, 1985. 173 с.

Осадчая Л. М., Галкина О. В., Ещенко Н. Д. Влияние коразола на активность Na^+ , K^+ -АТФазы и интенсивность ПОЛ в нейронах и нейроглии // Биохимические и молекулярно-биологические основы физиологических функций. 2004. Вып. 37. С. 220–226.

Павлов Д. С., Мещерякова О. В., Веселов А. Е., Немова Н. Н., Лупандин А. И. Показатели энергетического обмена у молоди атлантического лосося (*Salmo salar* L.), обитающей в главном русле и притоке реки Варзуга (Кольский п-ов) // Вопр. ихтиологии. 2007. Т. 47, № 6. С. 819–826.

Павлов Д. С., Нефедова З. А., Веселов А. Е., Немова Н. Н., Руоколайнен Т. Р., Васильева О. Б., Рипатти П. О. Липидный статус сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* L. из разных микробиотопов реки Варзуга // Вопросы ихтиологии. 2008. Т. 48, № 5. С. 679–685.

Павлов Д. С., Немова Н. Н., Нефедова З. А., Руоколайнен Т. Р., Васильева О. Б., Кириллов П. И., Кириллова Е. А. Липидный статус сеголеток микижи *Parasalmo mykiss* и кужуча *Oncorhynchus kisutch* // Вопросы ихтиологии. 2010. Т. 50, № 1. С. 120–129.

Павлов Д. С., Немова Н. Н., Кириллова Е. А., Кириллов П. И., Нефедова З. А., Мурзина С. А. Содержание липидов у сеголетков нерки *Oncorhynchus nerka* в период нагульной миграции (р. Озерная, Камчатка) // Доклады АН. 2012. Т. 445, № 1. С. 114–117.

Полякова Э. Д. Регуляция содержания холестерина в клетке // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М.: Наука, 1981. С. 120–127.

Проказова Н. В., Звездина Н. Д., Коротаева А. А. Влияние лизофосфатидилхолина на передачу трансмембранного сигнала внутрь клетки // Биохимия. 1998. Т. 63, вып. 1. С. 38–46.

Рыжков Л. П. Морфофизиологические закономерности и трансформации веществами энергии в раннем онтогенезе пресноводных лососевых рыб / Ред. Л. П. Рыжков. Петрозаводск: Карелия, 1976. 288 с.

Рыжков Л. П., Крупень И. М. Пресноводный лосось Онежского озера. Петрозаводск: ПетрГУ, 2004. 152 с.

Сидоров В. С. Экологическая биохимия рыб. Липиды / Ред. В. С. Сидоров. Л.: Наука, 1983. 240 с.

Сидоров В. С., Нефедова З. А., Юровицкий Ю. Г. Динамика фракционного состава липидов в желтке и жировых каплях в онтогенезе лосося // Онтогенез. 1996. Т. 27. С. 200–203.

Смирнов Ю. А. Пресноводный лосось (экология, воспроизводство, использование) / Ред. Ю. А. Смирнов. Л.: Наука, 1979. 156 с.

Сторожук А. Я. Некоторые особенности липидного обмена в онтогенезе сайды. Физиология морских рыб. М.: Пищевая промышленность, 1980. С. 7–19.

Финагин Л. К. Обмен холестерина и его регуляции. Киев, 1980. С. 11–16.

Шатуновский М. И. Экология размножения и развития. М.: Наука, 1980. 283 с.

Шустов Ю. А. Экологические аспекты поведения молоди лососевых рыб в речных условиях. СПб.: Наука, 1995. 161 с.

Шустов Ю. А. Экология молоди атлантического лосося. Петрозаводск: Карелия, 1983. 152 с.

Юровицкий Ю. Г., Нефедова З. А., Сидоров В. С. Динамика содержания липидов в эмбриональном и личиночном развитии лосося // Онтогенез. 1996. Т. 27. С. 89–94.

Cowey C. B., Bell J. G., Knox D., Fraser A., Youngson A. Lipids and lipid antioxidant systems in developing eggs of salmon (*Salmo salar*) // Lipids. 1985. Vol. 20, N. 9. P. 567–572.

Jalabert B. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals // Reprod. Nutr. Dev. 2005. Vol. 45. P. 261–279.

Johnson R. B. Lipid deposition in oocytes of Teleost fishes during secondary oocyte growth // Rev. Fish. Sci. 2009. Vol. 17, N 1. P. 78–89.

Kaitaranta J. K., Ackman R. G. Total lipid and classes of fish roe // Comp. Biochem. Physiol. B. 1981. Vol. 69. P. 725–729.

Kazakov R. V., Veselov A. Je. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) catches in Russia // J. Appl. Ichthyol. 1998. Vol. 14. P. 65–68.

Kozhina V. P., Terekhowa T. A., Svetashev V. I. Lipid composition of gametes and embryos of the sea urchin *Strongyloceptrotus intermedius* at early stades of development // Develop. Biol. 1978. Vol. 62, N. 2. P. 512–517.

Nissling A. A., Westin L. Egg buoyancy of Baltic cod (*Gadus morhus*) and its implications for cod stock fluctuations in the Baltic // Mar. Biol. 1991. Vol. 111. P. 33–35.

Ryuzaki M. Studies on lipids in anurans. I. Changes in the composition of four kinds of lipids during development in *Rana nigromaculata* // Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol. 1981. Vol. 5. P. 167–183.

Schuurmans Stekhoven F., Bonting S. L. Transport adenosine triphosphatases // Physiol. Rev. 1981. Vol. 61. P. 1–76.

Takama K., Zama K., Igarashi H. Change in the lipids during development of salmon eggs // Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 1969. Vol. 20. P. 118–126.

Tocher D. R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in Teleost fish // Rev. Fish. Sci. 2003. Vol. 12, N 2. P. 107–182.

Tocher D. R., Fraser J. R., Sargent A. J., Gamble J. C. Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus*) // Lipids. 1985. Vol. 20, N 2. P. 69–74.

Veselov A. Je., Kazakov R. V., Sysoyeva M. I., Bahmet I. N. Ontogenesis of reotactic and optomotor responses of juvenile Atlantic salmon // Aquaculture. 1998. Vol. 168. P. 17–26.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Немова Нина Николаевна

директор, главный научный сотрудник лаб. экологической биохимии, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 783615

Нефедова Зинаида Анатольевна

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: znefed@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 571879

Мурзина Светлана Александровна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: murzina.svetlana@gmail.com
тел.: (8142) 571879

Nemova, Nina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nemova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 783615

Nefyodova, Zinaida

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: znefed@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 571879

Murzina, Svetlana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: murzina.svetlana@gmail.com
tel.: (8142) 571879

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

ФОТОСИНТЕЗ И УСТЬИЧНАЯ ПРОВОДИМОСТЬ ЛИСТЬЕВ *CUCUMIS SATIVUS* L., ИСПЫТАВШИХ ДЛИТЕЛЬНЫЕ ИЛИ ПЕРИОДИЧЕСКИЕ КРАТКОВРЕМЕННЫЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ В РАЗНЫХ ФАЗАХ РОСТА

Е. Н. Икконен, Т. Г. Шибаета, Е. Г. Шерудило, М. И. Сысоева

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Проведена сравнительная оценка температурной зависимости видимого фотосинтеза и устьичной проводимости листьев *Cucumis sativus* L., испытанных длительное или кратковременные ежесуточные снижения температуры до 12 °С в лаг-фазе (неразвернувшийся лист) и в фазе экспоненциального роста (развернувшийся активно растущий лист). Постоянное воздействие температуры 12 °С независимо от того, проводилось ли оно в период лаг-фазы или в фазу экспоненциального роста листа, приводило к снижению фотосинтеза. В отличие от этого кратковременные периодические низкотемпературные воздействия, напротив, вызывали повышение скорости фотосинтеза. Причем если фотосинтез листа, подвергнутого ДРОП-обработке в фазе экспоненциального роста, увеличивался только в области высоких температур, то такая же холодовая обработка неразвернувшихся листьев приводила к увеличению интенсивности фотосинтеза не только при высоких, но и при низких температурах, тем самым значительно повышая адаптационный потенциал растений.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Cucumis sativus* L., видимый фотосинтез, устьичная проводимость, температура, фазы роста листа.

E. N. Ikkonen, T. G. Shibaeva, E. G. Sherudilo, M. I. Sysoeva. EFFECT OF SHORT- AND LONG-TERM LOW TEMPERATURE TREATMENTS ON PHOTOSYNTHETIC RATE AND STOMATAL CONDUCTANCE IN *CUCUMIS SATIVUS* L. LEAVES AT DIFFERENT GROWTH PHASES

A comparative assessment of the temperature dependence of net photosynthesis and stomatal conductance in *Cucumis sativus* L. leaves exposed to long-term or daily short-term temperature decreases to 12 °C during the initial lag-phase (not yet unfolded leaf) or exponential growth phase (an unfolded actively growing leaf) was made. Constant exposure to 12 °C irrespective of the leaf growth stage resulted in a reduced photosynthetic rate of the leaves. In contrast, a periodic short-term temperature drop increased the rate of photosynthesis. Leaves subjected to temperature drop treatment during the exponential growth phase increased the photosynthetic rate only at high

temperatures, while the same temperature drop treatments during the lag phase caused an increase in the photosynthetic rate at both high and low temperatures, thereby significantly increasing the adaptive potential of the plants.

К е y w o r d s: *Cucumis sativus* L., net photosynthesis, stomatal conductance, temperature, leaf growth stages.

Введение

У чувствительных к холоду видов растений при понижении температуры фотосинтез, как правило, подавляется [Климов, 2008]. Так, на примере огурца было показано, что длительное (несколько дней) выдерживание растений при низких температурах ингибировало фотосинтез [Климов и др., 1999] и снижало устьичную проводимость (УП) листьев [Икконен и др., 2012]. В отличие от продолжительного действия низкой температуры кратковременные ежесуточные снижения температуры способствовали повышению фотосинтеза и УП листьев огурца в условиях низких и высоких температур [Икконен и др., 2012]. Такого рода низкотемпературные воздействия обусловили расширение температурной области оптимума фотосинтеза и снижение температурной зависимости фотосинтеза [Сысоева, Икконен, 2012], что характерно для адаптированных к холоду растений [Головки и др., 2008].

Степень развития листа значительно влияет на его способность адаптироваться к условиям окружающей среды, в том числе температурным. Имеются данные о разных откликах зрелых и незрелых тканей листьев теплолюбивых растений на изменения температуры [Armstrong et al., 2006]. Поскольку устойчивость растений к стрессовым воздействиям не постоянна на всем протяжении онтогенеза, Т. В. Нестеренко с коллегами [2007] был предложен онтогенетический подход (учет возрастного состояния листа) в исследованиях влияния неблагоприятных факторов среды на фотосинтетический аппарат на уровне листа. Широко обсуждается вопрос о том, что наиболее полная адаптация к низким температурам достигается в ходе развития растительных тканей при данном температурном режиме, а ткани, сформированные ранее, не способны адаптироваться полностью [Campbell et al., 2007]. С другой стороны, показано, что завершившие рост листья теплолюбивого вида *Tradescantia albiflora* реагируют на длительное понижение температуры изменением интенсивности фотосинтеза и ультраструктуры клеток так же, как и листья, образовавшиеся и развившиеся в условиях холода [Буболо и др., 1988].

Было установлено, что кратковременные периодические снижения температуры индуцировали адаптационные изменения в фотосинтетическом и устьичном аппарате настоящих листьев огурца [Икконен и др., 2012; Сысоева, Икконен, 2012]. Однако неисследованным остается вопрос о влиянии данного вида низкотемпературного воздействия на листья, испытывавшие холодовые воздействия на ранних фазах роста. Таким образом, задачей настоящей работы являлась сравнительная оценка температурной зависимости фотосинтеза и УП листьев, испытывавших постоянное и кратковременное ежесуточное действие низкой температуры на разных фазах роста листа.

Материалы и методы

Семена огурца (*Cucumis sativus* L., гибрид Зозуля F1) проращивали в термостате при температуре 28 °C в течение двух суток, высаживали в вазоны с песком (полив питательным раствором Кнопа с добавлением микроэлементов, рН 6,2–6,4) и помещали в камеру искусственного климата. Растения выращивали в течение двух недель при температуре 23 °C, фотопериоде 12 ч, освещенности 120 мкмоль/(м²·с) фотосинтетически активной радиации (ФАР), влажности воздуха 60–70 %. По достижении фазы первого настоящего листа часть растений оставляли при температуре 23 °C (контроль), а остальные в течение 6 суток либо выращивали при постоянной низкой закалывающей температуре 12 °C (вариант ПНТ), либо ежесуточно подвергали снижениям температуры с 23 до 12 °C на 2 ч в конце ночного периода (вариант ДРОП). В период низкотемпературных воздействий первый лист находился в фазе экспоненциального роста (интенсивно растущий лист), а второй лист – в лаг-фазе (неразвернувшийся, медленно растущий лист). Затем растения всех вариантов переносили на две недели на последствие в первоначальные оптимальные свето-температурные условия.

Видимый фотосинтез и устьичную проводимость (УП) измеряли в конце эксперимента (через две недели после прекращения низкотемпературных воздействий) на первом и втором

настоящих листьях с использованием портативной фотосинтетической системы HCM-1000 (Walz, Германия). Измерения проводили в климатической камере при температуре воздуха 8, 13, 17, 22 и 33 °C и ФАР 200 и 800 мкмоль/(м²·с).

На рисунках приведены средние арифметические значения и их стандартные отклонения. Повторность при оценке интенсивности фотосинтеза и УП – 5-кратная. В статье обсуждаются величины, достоверно различающиеся при $p < 0,05$.

Результаты

Максимумы видимого фотосинтеза первого и второго листа у контрольных растений достигались при температуре 22 °C и достоверно не различались, составляя при низкой освещенности $6,3 \pm 0,3$ и $6,7 \pm 0,5$ мкмоль/(м²·с), при насыщающей – $9,1 \pm 0,3$ и $9,2 \pm 0,4$ мкмоль/(м²·с) соответственно (рис. 1).

Постоянная низкотемпературная предобработка растений (вариант ПНТ) даже после двух недель роста растений в оптимальных условиях снижала видимый фотосинтез первого и второго листьев растений во всем диапазоне температур при освещенности ниже насыщающей фотосинтез (см. рис. 1, а, в) и при температуре выше 22 °C в условиях насыщения фотосинтеза светом (см. рис. 1, б, г). В диапазоне температур 13–33 °C при обоих уровнях света ассимиляция CO₂ была более интенсивной у второго листа растений варианта ПНТ по сравнению с первым.

Кратковременные периодические низкотемпературные воздействия (вариант ДРОП) увеличивали по сравнению с контролем интенсивность фотосинтеза у первого и второго листа при температуре 33 °C и у второго листа – при температуре 8 °C независимо от уровня освещенности (см. рис. 1).

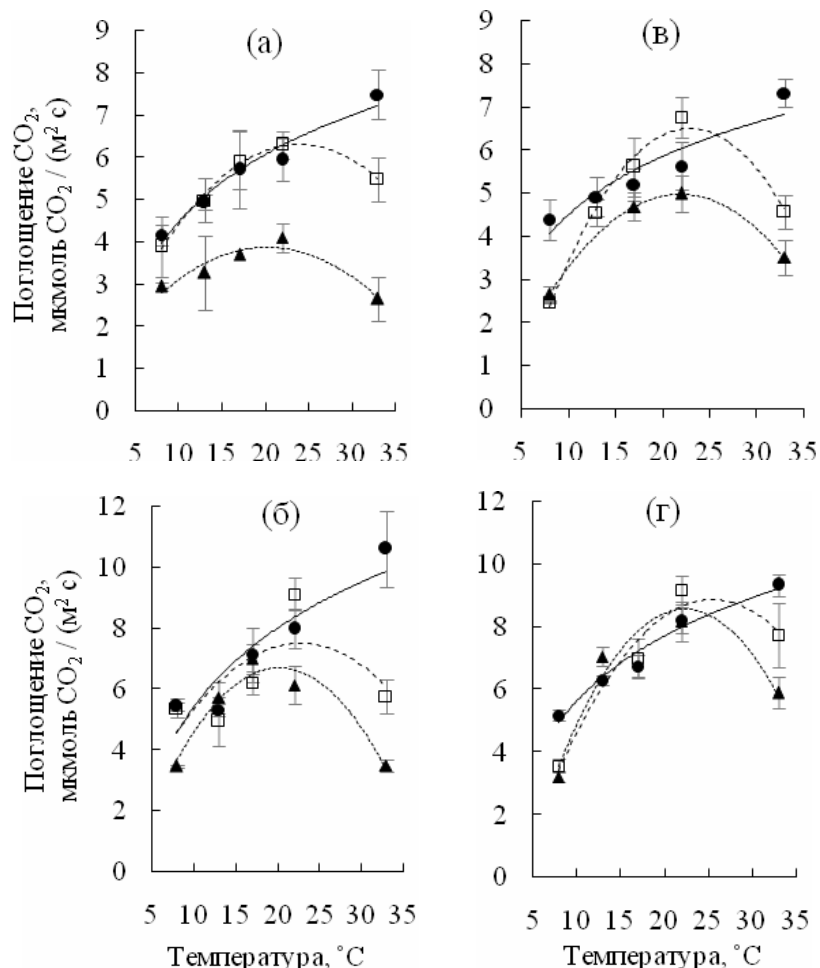


Рис. 1. Температурная зависимость видимого фотосинтеза первого (а, б) и второго (в, г) листьев растений огурца в последствии постоянного (ПНТ) и кратковременного ежесуточного (ДРОП) низкотемпературного (12 °C) воздействия при освещенности 200 (а, в) и 800 (б, г) мкмоль/(м²·с):

□ – контроль, ▲ – ПНТ, ● – ДРОП

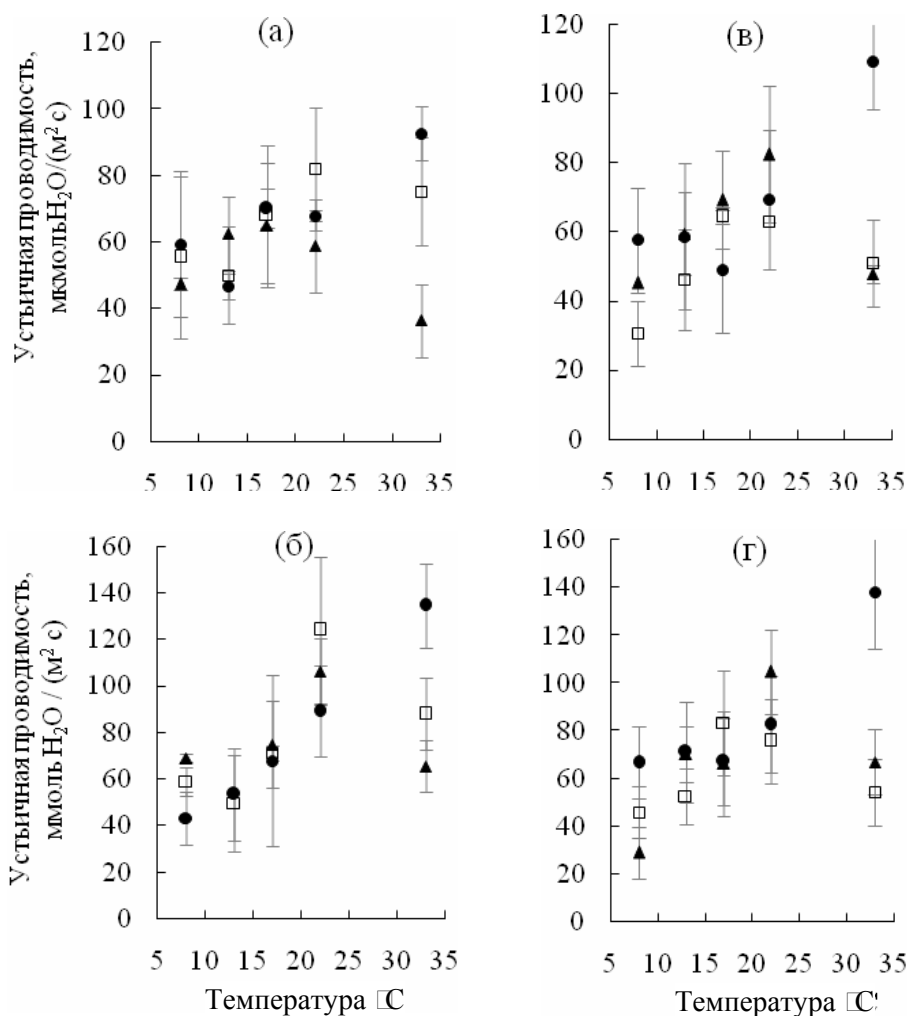


Рис. 2. Температурная зависимость устьичной проводимости первого (а, б) и второго (в, г) листьев растений огурца в последствии постоянного (ПНТ) и кратковременного ежесуточного (ДРОП) низкотемпературного (12 °C) воздействия при освещенности 200 (а, в) и 800 (б, г) мкмоль/(м²·с):

□ – контроль, ▲ – ПНТ, ● – ДРОП

В последствии ДРОП-обработки оба листа растений огурца продемонстрировали увеличение УП листьев в условиях высокой температуры (33 °C) (рис. 2). В области низких и оптимальных температур различия в величине УП между вариантами опыта были незначительны (см. рис. 2). Не выявлено достоверных различий интенсивности видимого фотосинтеза и УП первого и второго листа варианта ДРОП.

Обсуждение

Результаты данного исследования согласуются с утверждением о том, что разные температурные режимы выращивания растений приводят к адаптивным различиям температурной зависимости фотосинтеза [Головки и др., 2008]. Постоянное воздействие низкой закалывающей температуры, независимо от того,

проводилось ли оно в период лаг-фазы или в фазу экспоненциального роста листа, снижало фотосинтез во всем исследованном диапазоне температур при низкой освещенности и в области высоких температур при насыщающем свете. Кратковременные периодические низкотемпературные воздействия, напротив, способствовали повышению поглощения CO₂. Причем если фотосинтез листа, подвергнутого ДРОП-обработке в фазе экспоненциального роста, увеличился только в области высоких температур, то кратковременная холодовая обработка неразвернувшихся листьев увеличивала интенсивность фотосинтеза не только при высоких, но и при низких температурах, тем самым значительно расширяя адаптационный потенциал растений в последствии данного вида низкотемпературного воздействия. Возможно, что адаптационные изменения фото-

синтеза растений варианта ДРОП были инициированы ритмичностью непродолжительных низкотемпературных воздействий. Так, например, ранее было выявлено положительное влияние ритмичных периодических повышений содержания CO₂ в воздухе на фотосинтетические процессы [Кособрюхов, 2009].

Фаза роста листа имеет существенное влияние на его способность к адаптации. Было определено, что листья, формирование которых проходило в условиях пониженных температур, обладали большей адаптационной способностью, чем те, которые испытали воздействие холодом в зрелом состоянии [Armstrong et al., 2006]. Результаты данного исследования показали, что эффект воздействия низких закаливающих температур на фотосинтез растений может зависеть как от характера низкотемпературной предобработки, так и от фазы роста листа. Температурная зависимость фотосинтеза и абсолютные значения фотосинтеза у листьев, испытывавших ДРОП-обработку на разных фазах роста, были аналогичны. Однако более молодой на время низкотемпературного воздействия лист обладал впоследствии способностью поддерживать повышенный по отношению к контролю уровень фотосинтеза не только при высокой, но и при низкой температуре, что характерно для видов, адаптированных к холоду [Головкин и др., 2008]. Ранее нами было показано, что ежедневные кратковременные понижения температуры способствовали повышению фотосинтеза листьев огурца в области низких и высоких температур непосредственно после завершения низкотемпературных воздействий [Сысоева и др., 2011]. Видимо, в период роста растений в оптимальных условиях по завершении ДРОП-обработки способность первого листа поддерживать высокий уровень фотосинтеза при низкой температуре была утрачена. Фотосинтез второго листа, испытывавшего длительное низкотемпературное воздействие в начальной фазе роста, в последствии ингибировался низкими температурами в меньшей степени, чем фотосинтез первого листа, а в условиях насыщающего света и низких температур даже соответствовал уровню контрольных растений. Видимо, развитие второго листа в условиях ПНТ-обработки способствовало, согласно Климову с соавторами [2008], формированию структур клеток и тканей с повышенной по сравнению с первым листом устойчивостью к низкой температуре.

Ежедневные кратковременные снижения температуры способствовали повышению УП настоящих листьев огурца в области низких и

высоких температур непосредственно после завершения низкотемпературных воздействий [Икконен и др., 2012]. Спустя две недели роста в оптимальных температурных условиях высокий уровень УП при повышенной температуре сохранялся у первого листа растений варианта ДРОП (см. рис. 2, а, б). Второй лист растений этого варианта показал аналогичное первому листу раскрытие устьиц в ответ на краткосрочное действие высокой температуры (см. рис. 2, в, г). Возможно, повышение УП листьев, испытывавших ДРОП-воздействие на разных фазах роста, в ответ на высокую температуру связано с перераспределением абсцизовой кислоты (АБК) в растении, а именно с притоком гормона из побега в корень [Kudoyarova et al., 2011]. Такое перераспределение АБК приводит к возрастанию гидравлической проводимости корней, обеспечивая сбалансированность притока воды и ее испарения, что позволяет устьицам оставаться открытыми, поддерживая газообмен и фотосинтез растений. Кроме того, у листьев, испытывавших ДРОП-воздействие в период интенсивного роста, повышение УП непосредственно после окончания низкотемпературного воздействия могло повлиять на развитие устьичного аппарата и повышение плотности устьиц еще не развернувшихся листьев, находящихся на ранней стадии роста, как это было показано в работе Miyazawa с коллегами [2006].

Таким образом, результаты исследования позволили установить, что в отличие от длительных низкотемпературных воздействий, ингибирующих фотосинтез у чувствительных к холоду видов, периодические кратковременные снижения температуры до закаливающих значений могут приводить к увеличению интенсивности фотосинтеза и повышению адаптационного потенциала растений. Степень проявления реакции зависит от того, в какой фазе развития лист был подвержен действию низких температур.

Исследования выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-00840 а.

Литература

Буболо Л. С., Палеева Т. В., Кислюк И. М. Влияние температуры выращивания и кратковременной температурной акклимации на ультраструктуру клеток, фотосинтез и дыхание листьев *Tradescantia albiflora* (Commelinaceae) // Бот. журн. 1988. Т. 73, № 1. С. 45–53.

Головки Т. К., Дальке И. В., Бачаров Д. С. Мезоструктура и активность фотосинтетического аппарата трех видов растений сем. *Crassulaceae* в холодном климате // Физиология растений. 2008. Т. 55, № 5. С. 671–680.

Икконен Е. Н., Шибеева Т. Г., Сысоева М. И. и др. Устойчивая проводимость *Cucumis sativus* L. при длительном и кратковременном действии низких температур // Физиология растений. 2012. Т. 59, № 5. С. 1–5.

Климов С. В. Адаптация растений к стрессам через изменение донорно-акцепторных отношений на разных уровнях структурной организации // Успехи современной биологии. 2008. Т. 128, № 3. С. 281–299.

Климов С. В., Астахова Н. В., Трунова Т. И. Холодостойкость растений томата и огурца в связи с низкотемпературной активностью их фотосинтеза // Доклады АН. 1999. Т. 365, № 2. С. 279–282.

Кособрюхов А. А. Активность фотосинтетического аппарата при периодическом повышении концентрации CO₂ // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 1. С. 8–16.

Нестеренко Т. В., Тихомиров А. А., Шихов В. Н. Индукция флуоресценции хлорофилла и оценка устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям // Журнал общей биологии. 2007. Т. 68, № 6. С. 444–458.

Сысоева М. И., Икконен Е. Н. Оптимизация процессов фотосинтеза растений огурца при кратковременном и длительном низкотемпературных воздействиях // Тр. КарНЦ РАН. 2012. № 2. С. 159–161.

Armstrong A. F., Logan D. C., Atkin O. W. On the developmental dependence of leaf respiration: responses to short- and long-term changes in growth temperature // Amer. J. Bot. 2006. Vol. 93, N 11. P. 1633–1639.

Campbell C., Atkinson L., Zaragoza-Castells J. et al. Acclimation of photosynthesis and respiration is asynchronous in response to changes in temperature regardless of plant functional group // New Phytol. 2007. Vol. 176, N 2. P. 375–389.

Kudoyarova G., Veselova S., Hartung W. et al. Involvement of Root ABA and Hydraulic Conductivity in the Control of Water Relations in Wheat Plants Exposed to Increased Evaporative Demand // Planta. 2011. Vol. 233. P. 87–94.

Miyazawa S.-I., Livingston N. J., Turpin D. H. Stomatal development in new leaves is related to the stomatal conductance of mature leaves in poplar (*Populus trichocarpa* P. *Deltoids*) // J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57, N 2. P. 373–380.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Икконен Елена Николаевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия 185910
эл. почта: likkonen@gmail.com
тел.: (8142) 762706

Шибеева Татьяна Геннадиевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия 185910
эл. почта: kharkina@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Шерудило Елена Георгиевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия 185910
эл. почта: sherudilo@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Сысоева Марина Ивановна

главный научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия 185910

Ikkonen, Elena

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: likkonen@gmail.com
tel.: (8142) 762706

Shibaeva, Tatiana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: kharkina@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Sherudilo, Elena

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: sherudilo@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Sysoeva, Marina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia

УДК 581.154+575.224.46: 582.542.1.

ОСОБЕННОСТИ ОПУШЕНИЯ ЛИСТОВОЙ ПЛАСТИНКИ У РАСТЕНИЙ СЕВЕРНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *ARABIDOPSIS LYRATA* SUBSP. *PETRAEA* И *ARABIDOPSIS THALIANA*

Т. С. Николаевская, О. М. Федоренко

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Показано существенное различие между двумя видами рода *Arabidopsis* по характеру опушения розеточного листа растений северных популяций. В популяции *A. l. petraea* опушение листа отсутствует, что вызвано мутацией регуляторного гена *GLABROUS1*. У растений популяций *A. thaliana* на адаксиальной эпидерме листа встречались три типа трихом: простые (однолучевые); вильчатые (двухлучевые) и трехлучевые. Внутрипопуляционные различия выявлены по частоте трех типов трихом, межпопуляционные – только по частоте вильчатых трихом. Высокий уровень полиморфизма, особенности генетического разнообразия и распределения трихом на эпидерме и ее зонах характеризуют различия естественных континентальной и островных популяций. Установленные различия связаны с генетическими факторами и влиянием условий произрастания на формирование популяций *Arabidopsis*, находящихся на окраине ареала вида.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea*, трихомы, морфология, генетическое разнообразие, северные популяции.

T. S. Nikolaevskaya, O. M. Fedorenko. THE LEAF TRICHOME MORPHOLOGY FEATURES OF TWO *ARABIDOPSIS* PLANTS (*A. LYRATA* SSP. *PETRAEA* AND *A. THALIANA*) IN NORTHERN POPULATIONS

The main distinction between two species of *Arabidopsis* in leaf trichome production of plants in northern populations is shown. The lack of leaf trichomes in the *A. l. petraea* population is caused by a mutation in the regulatory gene *GLABROUS1*. Plants of *A. thaliana* populations had three types of trichomes on the adaxial epidermis: unbranched, two branched and three branched. Within-population differences concerned the frequency of each of the three trichome types, but interpopulation differences – only the frequency of two branched trichomes. The high level of polymorphism, peculiarities of the genetic diversity and trichome distribution across the epidermis and its zones characterize the distinctions between the natural continental and insular populations. The established distinctions are connected with genetic factors and the environmental conditions that influence *Arabidopsis* populations structure at the northern limit of the species range.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea*, trichome, morphology, genetic diversity, northern populations.

Введение

Клетки эпидермы многих растений образуют различные наружные выросты, так называемые трихомы, или волоски, которые встречаются на всех частях цветковых растений и могут быть как долговечными, так и эфемерными [Атлас..., 1980; Тутаюк, 1980]. Морфология трихом разнообразна: встречаются одноклеточные и многоклеточные волоски, ветвистые и простые, одревесневшие и живые – физиологически активные. Размеры кроющих и железистых волосков варьируют в значительных пределах: от нескольких микронов до нескольких сантиметров. Трихомы типичны для определенных видов, родов и семейств, они широко используются как диагностический показатель, в связи с чем признаку опушения придается самое существенное значение в таксономии семейства *Brassicaceae* и отмечается значительный внутривидовой полиморфизм [Beilstein et al., 2006]. Биологическое значение трихом, функции и адаптивная ценность неоднозначны. В частности, у растений семейства

Brassicaceae трихомы служат органами, поглощающими и испаряющими воду, отражающими свет на поверхности листа или препятствующими повреждению насекомыми; их филогения хорошо изучена [O’Kane, Al-Shehbaz, 2003; Beilstein et al., 2006].

Трихомы рода *Arabidopsis* относятся к типу кроющих волосков и представляют собой одноклеточные, редко многоклеточные выросты эпидермальных полиплоидных клеток [Haughn, Somerville, 1988; Marks, 1997; Schwab et al., 2000]. Они встречаются практически на всех органах растений. Как и у большинства *Brassicaceae*, трихомы *Arabidopsis* – это разветвленные или одностебельчатые клетки с утолщенной клеточной стенкой и папиллярной кутикулой (рис. 1). Основание трихомной клетки окружено одним слоем клеток, отличающихся от других эпидермальных клеток прямоугольной формой. Трихомы рано дифференцируются из отдельных протодермальных клеток в процессе развития эпидермы листьев и стеблей видов рода *Arabidopsis* и размещаются на адаксиальной, реже абак-

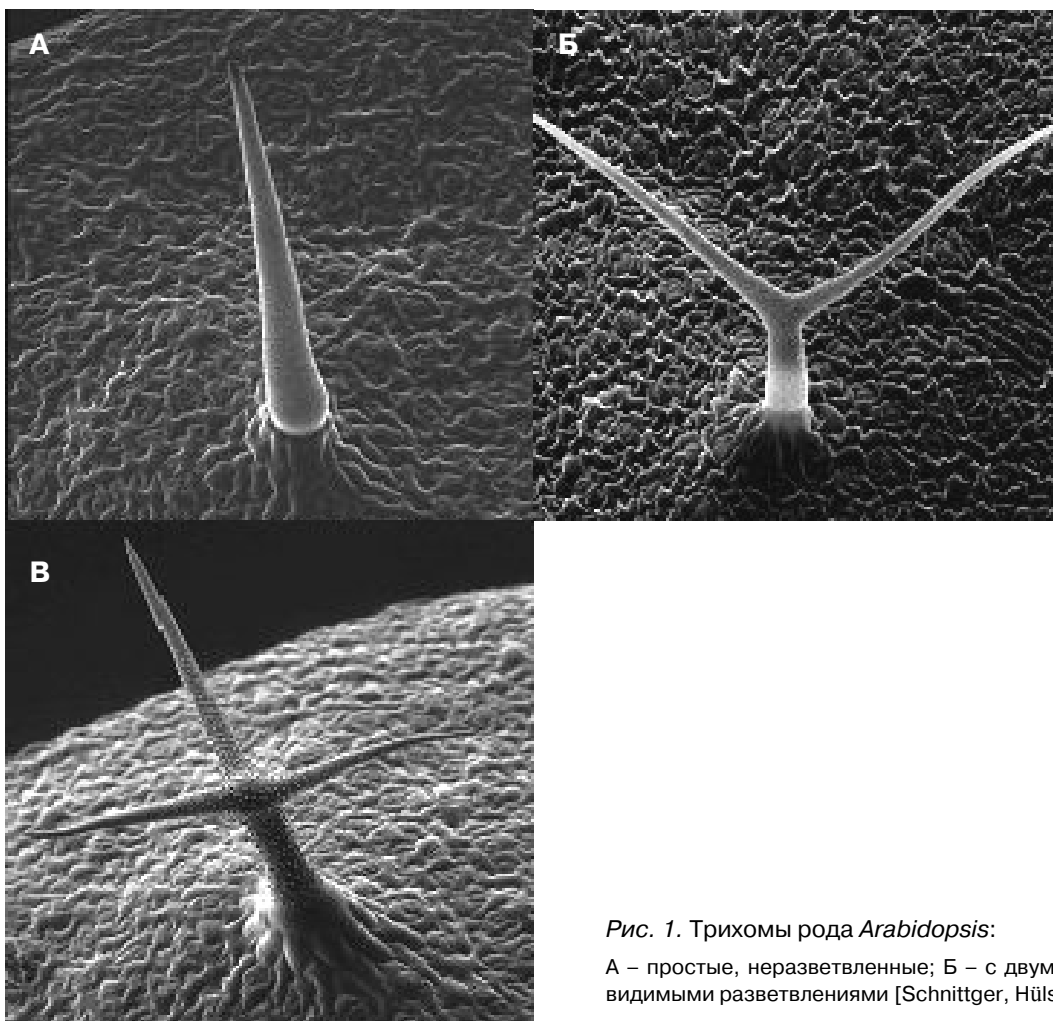


Рис. 1. Трихомы рода *Arabidopsis*:

А – простые, неразветвленные; Б – с двумя и В – с тремя видимыми разветвлениями [Schnittger, Hülskamp, 2002]

сиальной поверхностях листовой пластинки или локализируются по ее краю и в центре вдоль жилок [Larkin et al., 1996].

Изучение генетического контроля инициирования и развития трихом *Arabidopsis* позволило выделить шесть групп генов: *GLABRA1* (*GL1*), *AtMYB23*, *GLABRA2* (*GL2*), *GLABRA3* (*GL3*), *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) и *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* (*TTG1*) [Larkin et al., 1993; Payne et al., 2000; Kirik et al., 2001; Ohashi et al., 2002]. Многие из этих генов также вовлечены в развитие волосков корня.

Гены *GL1* и *AtMYB23* – регуляторные, кодируют факторы транскрипции *R2R3-MYB*-типа. Результат мутаций в *GL1* – отсутствие трихом на поверхности листа, но они не затрагивают развитие волосков корня [Larkin et al., 1993]. Ген *AtMYB23* функционально с *GL1* регулирует развитие трихом на краях листа. Потеря функции *AtMYB23* также приводит к дефектам в морфогенезе трихом [Perazza et al., 1999; Kirik et al., 2001]. Кивимяки с соавторами [Kivimäki et al., 2007] показали, что мутации в начале третьего экзона гена *GL1* (по крайней мере до позиции 96 нуклеотида) у растений *A. lyrata* шведских и норвежских популяций приводят к отсутствию трихом. Такие растения без опушения больше повреждаются травоядными насекомыми по сравнению с особями, продуцирующими трихомы. Результаты изучения кодирующей области *GL1* позволили авторам предположить, что независимые мутации в этом регуляторном гене обеспечивают основы для параллельной эволюции снижения устойчивости к травоядным насекомым в различных популяциях *A. l. petraea* и у родственного ему вида *A. thaliana*. Подобный полиморфизм авторы рассматривают как адаптивную реакцию организмов, возникшую в ходе эволюции вида дивергентным путем.

Ген *GL2* также кодирует фактор транскрипции и необходим для нормального морфогенеза трихом. Он регулирует распределение трихом по поверхности листа у растений рода *Arabidopsis*. Мутации в этом локусе приводят к неправильному размещению и развитию трихом, при котором большинство трихом не разветвляется и имеет единственную ветвь [Rerie et al., 1994; Szymanski et al., 1998]. Гибридизация *in situ* показала, что ген *GL2* экспрессируется в трихомах прародительских клеток и определяет процесс их формирования [Gao et al., 2008].

Мутации в *GL3* имеют малое влияние на инициирование трихом и сильное влияние на их разветвление, размер клетки [Payne et al., 2000; Szymanski, 2001; Gao et al., 2008]. Ген

EGL3 функционально связан с *GL3*. Мутации в *EGL3* уменьшают число трихом и их разветвление, а мутанты *gl3*, *egl3* проявляют фенотип с гладким листом [Oppengeimer et al., 1997]. Были идентифицированы также мутации, которые разрушительно влияют на инициирование трихом, их развитие, расположение, плотность и морфологию.

В целом выделено более 15 генов, вовлеченных в регулирование разветвлений трихом. Форма ветвления у *Arabidopsis* наследуется как полигенный признак с относительно низкой наследуемостью из-за неаддитивности взаимодействия генов и сильного влияния средовой компоненты [Oppenheimer et al., 1997]. Клонирование *ZWICHEL* (*ZWI*), *ANGUSTIFOLIA* (*AN*) и *STICHEL* (*STI*) генов указывает, что в формировании разветвлений большую роль играют микроканальцы цитоскелета, связанные с регуляцией клеточных делений [Schnittger, Hülskamp, 2002]. Современные гипотезы о контроле клеточного морфогенеза утверждают, что рост клеток находится в прямой связи с протеином цитоскелета и биосинтезом микрофибрилл клеточной стенки [Oppengeimer et al., 1997; Szymanski, 2001; Pesch, Hülskamp, 2011]. Возможно, что продукт локуса, контролирующего морфологию трихом, является компонентом цитоскелета. Например, *DIS1* и *DIS2* могут кодировать специфику микротрубочек, которые синтезируются в клетках трихом. Последний аспект подтверждается идентификацией сямского мутанта *Arabidopsis* с многоклеточными трихомами [Haughn, Somerville, 1988].

Необходимо отметить, что, несмотря на подробно изученную генную регуляцию морфогенеза трихом у *Arabidopsis*, вопросы популяционной изменчивости признака у естественно произрастающих растений северных популяций затрагиваются редко. В связи с этим целью нашей работы явилось сравнительное морфометрическое исследование опушения листа у растений из популяций рода *Arabidopsis*, расположенных на северной границе их ареала. Изучались особенности опушения на поверхности листовой пластинки и в отдельных ее зонах (апикальной, базальной и латеральной) у двух видов *Arabidopsis*, а также характер внутривидового разнообразия по этому признаку.

Материалы и методы

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. — диплоидное ($2n = 10$) самоопыляющееся растение из семейства Brassicaceae, имеющее неболь-

шой размер генома (около 100000 kb или 125 млн пар нуклеотидов), с низкой долей высокоповторяющейся ДНК. Растение однолетнее или двулетнее озимого типа. Характерные места обитания арабидопсиса в Карелии, территория которой принадлежит к зоне крайней северной границы ареала этого вида, – скалы с бедным почвенным покровом, в сообществе с типичной скальной растительностью. В таких приграничных районах популяции испытывают давление неблагоприятных для вида экологических условий. Исследовались растения трех природных популяций: двух изолированных, расположенных на островах Онежского озера Радколье и Большой Климецкий, и одной континентальной в пригороде Медвежьегорска. Далее в тексте все популяции названы по месту расположения.

Arabidopsis lyrata subsp. *petraea* (L.) O'Kane, Al-Shehbaz. — диплоидный ($2n = 16$) перекрестноопыляющийся вид семейства Brassicaceae с относительно небольшим геномом (около 207 млн пар нуклеотидов). Размер диплоидного генома *A. l. petraea*, определенный с помощью метода проточной цитометрии, составляет 0,46–0,51 пг и приблизительно в два раза превышает размер генома *A. thaliana* (0,23–0,29 пг) [O'Kane, Al-Shehbaz, 2003; Clauss et al., 2006]. *A. l. petraea* – многолетнее травянистое растение, образующее небольшие розетки, со слабо облиственными репродуктивными побегами высотой около 10–20 сантиметров. Исследуемая нами популяция находилась в пригороде Медвежьегорска на крутых песчаных откосах реки Кумса.

Для анализа листовой пластинки семена растений всех четырех исследуемых популяций высевали в почву и доращивали в установке с люминесцентными лампами при температуре 21 °C и круглосуточном освещении до появления полноценной розетки и репродуктивного побега. При изучении характера опушения использовали оптическую лупу МБС-9. Подсчет трихом производили в 20 полях зрения с увеличением 6*2х. Выборка составила по 20 растений из популяций того и другого вида. Все полученные данные были обработаны с помощью статистических методов [Зайцев, 1984].

Показатели внутривидового разнообразия *Arabidopsis* определяли по методу Л. А. Животовского [1982]. В качестве морф выделяли три морфологических типа волосков листа: простые, двухлучевые и трехлучевые. Вычисляли следующие показатели:

среднее число морф в популяции:

$$\mu = (\sqrt{p_1} + \sqrt{p_2} + \dots + \sqrt{p_m})^2; \quad (1)$$

статистическую ошибку (s_μ):

$$s_\mu \sim \sqrt{\mu(m-\mu)/N}; \quad (2)$$

долю редких морф в популяции (h):

$$h = 1 - \mu/m; \quad s_h \sim \sqrt{h(1-h)/N}; \quad (3)$$

показатель сходства популяций (r):

$$r = \sqrt{p_1q_1 + p_2q_2 + \dots + p_mq_m}; \quad (4)$$

критерий идентичности (I):

$$I = 8N_1N_2 / (N_1 + N_2) * (1 - r - (p_0 + q_0)/4), \quad (5)$$

где m – число морф, p и q – частоты фенотипов в разных популяциях, N – объем выборки.

Показатель μ дает оценку разнообразия по числу морф. Максимально возможное его значение равно m при одинаковой частоте всех морф. При неравномерном распределении частот морф $\mu < m$. При мономорфизме $\mu = 1$.

Доля редких морф в популяции (h) дает информацию о характере и структуре внутривидового разнообразия. Значение показателя сходства популяций (r) не превышает 1. Оно равно 1 в тех случаях, когда сравниваемые популяции идентичны (по частотам морф). Оно равно 0 тогда, когда сравниваемые популяции не имеют ни одной общей морфы. Критерий идентичности (I) – это еще один метод сравнения выборок, основанный на значениях показателя сходства популяций (r). Если I превышает табличное значение, то между выборками есть различие на соответствующем уровне значимости [Животовский, 1982].

Уровень межвидовых различий и внутривидовой изменчивости исследуемых растений *Arabidopsis* по количеству трихом в эпидерме розеточного листа определяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA).

Для оценки действия стабилизирующей формы естественного отбора вычисляли среднюю арифметическую, а также разность между средним и конкретным значением изучаемого признака. Полученные ряды разностей ранжировали. Отклонения от средней (+ или –) графически были представлены прямыми (линии рассеяния, тренды) с разными углами наклона (крутизна) к оси абсцисс, по которым устанавливали степень различий между группами индивидуумов (особей) в отношении действия стабилизирующего отбора. Использовали формулу:

$$y = a + bx, \quad (6)$$

где y – разность между средним и конкретным значением признака; a – значение пересечения линии тренда с осью Y ; $b = \text{tg}$ угла наклона линии тренда, x – номер ранга особи. Высокие значения коэффициента детерминации (R^2) позволяют считать результаты статистически достоверными [Лебедева и др., 2007].

Результаты и обсуждение

Arabidopsis lyrata subsp. *petraea*

Морфологическое исследование растений Медвежьегорской популяции *A. l. petraea* показало, что на их листовых пластинках отсутствовали какие-либо следы опушения, это обнаруживается уже в ювенильной фазе развития (рис. 2, А). Однако известно, что во многих природных популяциях *A. l. petraea* встречаются растения и с опушением на эпидерме листа [Clauss et al., 2006; Kivimäki et al., 2007].

Так, среди пяти шведских популяций этого вида были выявлены четыре полиморфные по данному признаку популяции, в которых с различной частотой встречались растения и с опушением (рис. 2, Б), и без него. Одна из популяций, состоящая из растений без опушения, так же как и Медвежьегорская, была мономорфной [Kivimäki et al., 2007]. Как было указано во введении, число генов, участвующих в образовании трихом, велико, однако регуляторный ген (*GL1*) является основным в процессе инициации и развития трихом, и делеция в этом гене приводит к появлению растений с отсутствием опушения [Herman, Marks, 1989; Larkin et al., 1993]. Генетические исследования *A. l. petraea* показали, что ген, гомологичный кандидату гена *GL1*, описанному у *A. thaliana*, имеет мутации в кодирующей области (третий экзон), и они подавляют развитие опушения [Kivimäki et al., 2007]. В частности, в популяциях Швеции и Норвегии были выявлены три мутации в третьем экзоне *GL1*: одна несинонимичная замена в позиции 95 нуклеотида (мута-

ция названа A95D), 3 п.н.-делеция (делеция размером в три пары нуклеотидов) в позиции 148 и 7 п.н.-инсерция в позиции 215. Они вызывают замену аминокислот и изменение свойств кодируемого белка у *A. l. petraea*, в отличие от нуклеотидной последовательности *GL1* у продуцирующих трихомы растений *A. thaliana* (рис. 3).

В то же время растения *A. l. petraea* немецкой популяции продуцировали трихомы, хотя имели аналогично растениям шведских популяций 3 п.н.-делецию и 7 п.н.-инсерцию, но расположенную далее 96 нуклеотида [Hauser et al., 2001]. У растений Медвежьегорской популяции *A. l. petraea* в отличие от популяций Швеции и Норвегии, несущих упомянутые выше мутации в третьем экзоне, отсутствие опушения было вызвано другими причинами, а именно – 4 п.н.-инсерцией в начале третьего экзона (см. рис. 3). Таким образом, наиболее вероятно, что у северных популяций *A. lyrata* различные мутации в начале третьего экзона гена *GL1* (по крайней мере до позиции 96 нуклеотида) приводят к отсутствию опушения, и это является их отличительной особенностью.

Arabidopsis thaliana

В исследованных нами популяциях *A. thaliana* – одной континентальной (Медвежьегорская) и двух островных (Климецкая и Радколье) – трихомы обнаруживались уже на ранних стадиях розеточных листьев (рис. 4, А, Б). Причем опушение у них располагалось только на адаксиальной, верхней эпидерме листовой пластинки. Нижняя, абаксиальная эпидерма не имела волосков.

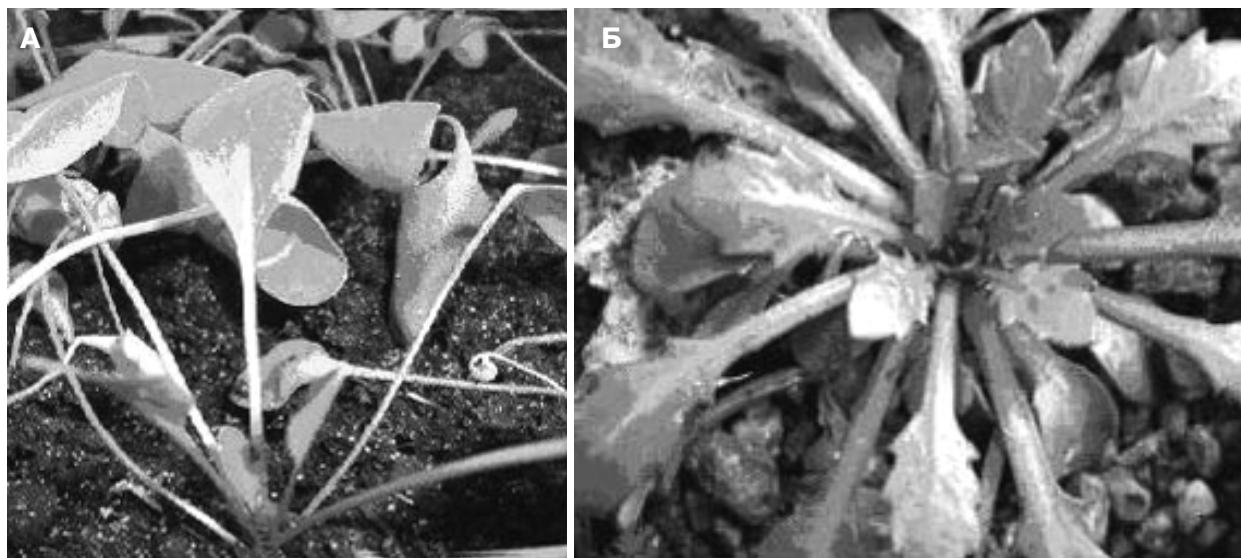


Рис. 2. Растения *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea*:

А – ювенильные растения *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea*, Медвежьегорская популяция; Б – растения *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea* с опушенными листьями [Kivimäki et al., 2007]

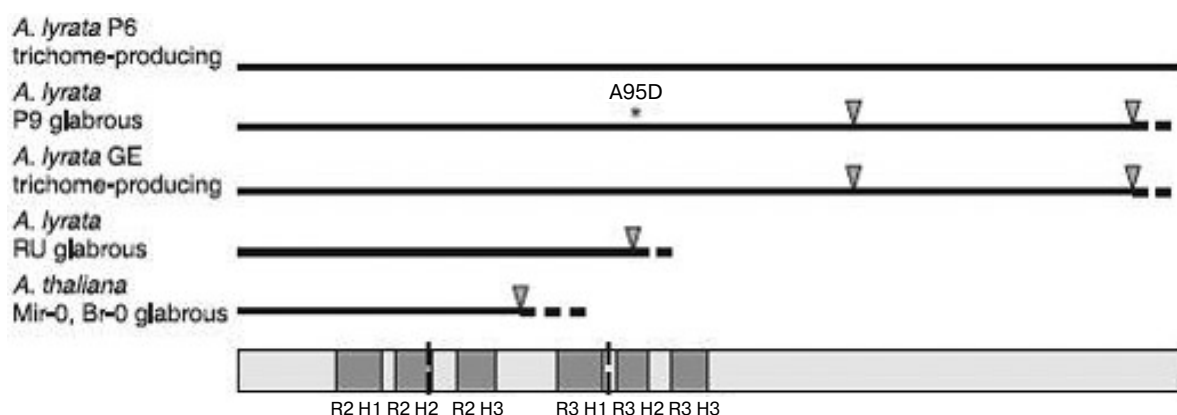


Рис. 3. Мутации в гене *GL1* у *Arabidopsis lyrata*, ассоциированные с отсутствием опушения [Kivimäki et al., 2007]:

▽ – инсерции и делеции, * – позиция несинонимичной замены (A95D). *A. lyrata* P6 и P9 – популяции из Швеции; *A. lyrata* GE – популяция из Германии; *A. lyrata* RU – популяция из России (Карелия). Для сравнения приведена делеция в одну пару нуклеотидов в двух образцах *A. thaliana* (Mir-0 – Италия и Br-0 – Чехословакия). В нижней части рисунка указаны функционально важные области *GL1* Мyb-белка: представлена измененная белковая последовательность в результате мутации. R2 и R3 – повторы и соответствующие им спирали, 1–3 изображены серыми квадратами; границы экзона – прерывистые вертикальные линии

Общее количество трихом на лист у всех трех популяций различалось (табл. 1). Так, у растений континентальной Медвежьегорской популяции насчитывалось в среднем в 1,8–2,2 раза больше трихом, чем в островных Радколье и Климецкой популяциях (31 и 24 трихомы соответственно). Поскольку уровень различий довольно высок ($p = 0,001$), то можно предположить, что растения островных популяций или несут мутации в регуляторных генах, или у них существуют какие-то другие генетические

ограничения, проявляющиеся в период раннего развития трихом. В частности, известно наличие у растений *A. thaliana* популяции Landsberg erecta локуса Reduced Trichome Number (RTN), который затрагивает иницирование листовых трихом и приводит к редукции их количества [Larkin et al., 1996].

В отличие от растений *A. thaliana* популяции Columbia, характеризующейся наличием трихом только дикого типа (трехлучевые), в эпидерме листа взрослых растений северных по-

Таблица 1. Варьирование количества трихом разных типов в эпидерме растений *A. thaliana*

Статистические показатели	Типы трихом			
	Простые	Двухлучевые	Трехлучевые	Всего
Популяция острова Радколье (розеточный лист, шт.)				
$M \pm s_m$	$3,64 \pm 0,23$	$24,45 \pm 0,73$	$4,39 \pm 0,24$	$30,81 \pm 0,82$
σ	2,61	9,27	2,69	10,40
V	71,62	37,93	61,25	33,76
Популяция острова Климецкий (розеточный лист, шт.)				
$M \pm s_m$	$3,90 \pm 0,25$	$18,78 \pm 0,46^{***}$	$3,81 \pm 0,24$	$24,35 \pm 0,47^{***}$
σ	2,76	5,83	2,55	5,89
V	70,86	31,02	66,76	24,18
Континентальная популяция Медвежьегорск (розеточный лист, шт.)				
$M \pm s_m$	$15,47 \pm 0,62^{***}$	$34,45 \pm 0,62^{***}$	$6,33 \pm 0,32^{***}$	$56,25 \pm 0,51^{***}$
σ	7,89	7,88	3,99	7,69
V	50,97	22,87	62,95	13,67
Континентальная популяция Царевичи (каулиновый лист, шт.)				
$M \pm s_m$	$9,39 \pm 0,47^{***}$	$2,88 \pm 0,25$	$1,57 \pm 0,30^{**}$	
σ	2,63	1,27	0,78	
V	28,01	44,21	50,07	
Континентальная популяция Царевичи (черешок розеточного листа, шт.)				
$M \pm s_m$	$4,12 \pm 0,88$	$5,33 \pm 1,22$		
σ	2,474	3,01		
V	59,99	56,46		

Примечание. Здесь и в табл. 2 отличия по количеству трихом от растений популяции о. Радколье достоверны: * – при $p = 95\%$; ** – при $p = 99,9\%$; *** – при $p = 999,9\%$; M – средняя арифметическая; s_m – ошибка средней; σ – среднее квадратическое отклонение; V – коэффициент вариации. В популяции Царевичи звездочками показан уровень отличия простых и трехлучевых трихом от двухлучевых.



Рис. 4. Растения *A. thaliana*, выращенные в лабораторных условиях. А – ювенильное и Б – взрослое растения с видимым опушением

пуляций встречались сразу три типа трихом: простые (однолучевые), двухлучевые и трехлучевые. Простые трихомы представляют собой вырост эпидермальной клетки, не имеющий никаких ответвлений (рис. 1, А). Двухлучевые (вилочатые) трихомы – это волоски с двумя одинаковой длины ветвями, а трехлучевые – с тремя одинаковыми или реже разной длины ветвями (рис. 1, Б, В). Как полагают, двухлучевые и простые трихомы у *A. thaliana* – это результат мутаций в различных генах, определяющих морфогенез полиплоидных клеток эпидермы и процесс появления в них трихом [Schnittger, Hülkamp, 2002].

Морфологический анализ показал, что количество трихом разных типов на поверхности розеточного листа было неоднозначным. Так, у растений всех популяций количественно преобладали двухлучевые трихомы, их насчитывалось в 5–6 раз больше, чем трихом двух других типов. Трихомы дикого типа, т. е. трехлучевые, так же как и простые, у растений островных популяций встречались в незначительном числе (табл. 1). Статистические различия по их количеству между растениями островных популяций не выявлены, хотя в популяции Радколье трехлучевых трихом оказалось чуть больше, чем простых, и в 1,2 раза больше, чем трихом тех же типов у растений о. Климецкий.

Растения континентальной Медвежьегорской популяции несколько выделялись количественным соотношением разных типов трихом (см. табл. 1). По сравнению с растениями островных популяций Радколье и Климецкой у них встречалось значительно больше, в 4,25–3,9 раза соответственно, простых трихом и в 1,4–1,66 раза соответственно больше трехлучевых.

Как и у растений двух других популяций, вилочатые волоски преобладали, и их тоже было соответственно в 1,4–1,8 раза больше, чем в эпидерме листа островных растений.

Варьирование биологических данных в обеих островных популяциях оказалось очень высоким (51–72 %), но чуть ниже – в континентальной (22–62 %). Особенно большой разброс значений наблюдался во всех случаях для трихом дикого типа и однолучевых (см. табл. 1).

В основных зонах эпидермы розеточного листа (апикальной, базальной и латеральной) количество трихом разных типов у растений всех популяций было практически одинаковым. Характер распределения трихом в разных зонах листа, так же как и при анализе их общего количества в целом на лист, сохранял ту же тенденцию: двухлучевых волосков всегда на порядок больше, чем простых и трехлучевых (табл. 2). Количество трехлучевых волосков оказалось совершенно одинаковым во всех зонах листа и для всех популяций. Различия между островными популяциями оказались существенными по числу как двухлучевых, так и простых волосков. Однако в двух популяциях (Климецкая и Медвежьегорская) простых трихом в растениях насчитывалось несколько больше, чем трехлучевых. Причем у растений Медвежьегорской популяции они оказались многочисленнее в апикальной и базальной частях листа. Приведенный выше анализ локализации трихом в разных зонах листа, с одной стороны, подчеркивает характерные различия между островными и континентальными популяциями *A. thaliana*. Как оказалось, две популяции – островная Радколье и континентальная Медвежьегорская – сходным образом отличались от по-

Таблица 2. Количество трихом, локализованных в разных зонах розеточного листа растений популяций *A. thaliana*

Популяции <i>A. thaliana</i>	Зоны розеточного листа								
	Апикальная			Базальная			Латеральная		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Радколье	3 ± 0,20	11 ± 0,23	3 ± 0,18	3 ± 0,18	11 ± 0,21	3 ± 0,19	3 ± 0,17	11 ± 0,20	3 ± 0,18
Климецкий	5 ± 0,30	8 ± 0,34	3 ± 0,27	5 ± 0,28	8 ± 0,33	3 ± 0,19	5 ± 0,31	8 ± 0,35	3 ± 0,25
Медвежье-горск	7 ± 0,35	12 ± 0,4	3 ± 0,19	6 ± 0,3	11 ± 0,31	3 ± 0,21	5 ± 0,26	12 ± 0,30	3 ± 0,19
Критерий Стьюдента (t)									
Радколье / Климецкий	4,05***	8,06***	0,27	4,86***	7,66***	1,66	4,70***	7,72***	0,30
Радколье / Медвежье-горск	8,27***	0,79	0,67	8,08***	0,29	0,23	5,10***	2,41*	0,26
Климецкий / Медвежье-горск	8,27***	0,79	0,67	8,08***	0,29	0,23	5,10***	2,41*	0,26

Примечание. 1 – простые, 2 – двухлучевые и 3 – трехлучевые трихомы.

пуляции о. Б. Климецкий. В обеих популяциях количество двухлучевых трихом во всех зонах было больше в 0,7 раза. Помимо того, растения о. Радколье обнаруживали в 0,6–0,4 раза меньшее количество простых трихом во всех трех зонах по сравнению с популяциями Медвежьегогорска и о. Б. Климецкий соответственно. С другой стороны, выявленный характер распределения трех типов трихом подчеркивает неоднозначность процессов морфогенеза эпидермы и его генной регуляции в разных зонах листа. Количество трехлучевых волосков оказалось одинаковым в каждой из трех зон листа у растений всех популяций. Этот факт, возможно, подтверждает, что указанный тип трихом является характерным (диким) для арабидопсиса. Варьирование же числа трихом двух других типов в разных зонах листа связано скорее всего с разной экспрессией регуляторных генов и мутациями в различных локусах. Так, известно, что инициирование трихом на краях листа регулируется геном *AtMYB23*, который функционально накладывается с геном *GL1* [Kirik et al., 2001].

Опушение обнаруживалось также и в эпидерме черешка и каулиновых (стеблевых) листьев. Характер их опушения и распределение трихом были изучены у растений континентальной популяции Царевичи и значительно отличались от опушения розеточных листьев (см. табл. 1).

Оказалось, что в эпидерме каулиновых листьев и их черешков преобладают не двухлучевые, как у розеточных, а простые трихомы. Двухлучевые встречались в 3,2 раза реже, чем простые, а трехлучевые трихомы чрезвычайно редки. При этом чем выше на цветочном стебле расположен лист, тем более редким становится его опушение [Hauser et al., 2001]. Эпидерма че-

решка также отличается практически полным отсутствием трехлучевых трихом, однако другие два типа встречаются здесь с близкой частотой, но в меньшем количестве, чем в розеточных листьях растений других популяций.

Эти различия, с одной стороны, связаны с условиями развития тех и других листьев. Для розеточных, возникающих ранней весной и подвергающихся резким колебаниям температуры вплоть до заморозков, необходим более плотный и густой защитный покров эпидермы, тогда как каулиновые листья возникают позже, при более благоприятном температурном режиме, и необходимость в подобной защите отпадает. С другой стороны, к моменту репродуктивного развития растений, когда меняются все физиологические ростовые процессы, возможно, нарушается экспрессия генов, которые регулируют нормальное развитие трихом в эпидерме генеративного стебля, и те или иные мутации усиливаются [Larkin et al., 1993; Gao et al., 2008].

Необходимо отметить, что у растений всех популяций встречались листья с отсутствием или простых, или трехлучевых трихом, тогда как двухлучевые присутствовали на всех рассмотренных образцах. Частота листьев без простых трихом в популяции Медвежьегогорска оказалась немного меньшей (10 %), чем у растений о. Радколье и о. Б. Климецкий (21 и 16 %) соответственно. Трехлучевые волоски отсутствовали у более значительного числа растений, но во всех популяциях примерно с одинаковой частотой – 31, 31 и 43 % соответственно. Листья, в эпидерме которых отсутствовали и простые, и трехлучевые трихомы, обнаружались в незначительном количестве в популяциях о. Б. Климецкий – 0,05 и о. Радколье – 0,02, тогда как в Медвежьегогорской их доля оказалась

наибольшей – 0,13. Частота отсутствия тех или иных типов трихом в различных зонах листа не показала каких-либо значительных особенностей, тем не менее немного различалась в разных популяциях. Так, в Климецкой эта доля была наибольшей и составила 0,074–0,076, в Радколье – 0,053–0,061 и менее всего в Медвежьегорской – 0,043–0,050.

Таблица 3. Частота различных типов трихом в популяциях *A. thaliana* (в долях)

Популяции	Всего трихом	Типы трихом		
		простые	двухлучевые	трехлучевые
Климецкая	62011	0,307	0,564	0,127
Радколье	7557	0,159	0,704	0,135
Медвежьегорская	9000	0,275	0,612	0,112

Таким образом, в пуле проанализированных листьев трех популяций *A. thaliana* (160 листовых пластинок в каждом случае), произрастающих в различных экологических условиях, обнаруживается вполне явный полиморфизм, связанный с варьированием количества трихом разных морфологических типов. Наличие в изученных популяциях нескольких вариантов (или морф) данного признака позволило оценить уровень внутри- и межпопуляционной изменчивости вида *A. thaliana*. Известно, что вклад признаков в величину показателя популяционной изменчивости пропорционален их частоте в популяциях [Животовский, 1982], поэтому варианты признака в нашем исследовании представлены в таблице 3 частотами различных типов трихом, а показатели внутрипопуляционного разнообразия – в таблице 4.

Как видно, уровень внутрипопуляционного разнообразия оказался идентичным в популяциях Климецкой и Медвежьегорской (см. табл. 4). В популяции о. Радколье он был наименьшим; возможно, в связи с тем, что частота простых

и трехлучевых трихом почти одинакова и они составляют одну редкую морфу. В Климецкой и Медвежьегорской популяциях в качестве редкой морфы выступают только трехлучевые трихомы, и потому здесь популяционное разнообразие определяется частотами всех трех типов волосков.

Попарные показатели генетического сходства популяций, свидетельствующие о степени их родства и уровне различий, оказались в целом довольно высокими (см. табл. 4). Однако необходимо отметить, что наиболее тесным родством обладают островные популяции Радколье и Климецкая, вследствие близости экологических условий, в которых они формировались. Меньшим генетическим сходством отличается от них континентальная популяция Медвежьегорска, причем наиболее далеко она отстоит от популяции о. Б. Климецкий (см. табл. 4). Критерий идентичности ($I_{\text{эксп}}$) свидетельствует о том, что генетические различия между популяциями значимы на соответствующем высоком уровне ($W = 0,001$). Представленные генетические взаимоотношения исследованных популяций вполне согласуются с данными кластерного анализа методом UPGMA на основе значений дистанций Нея [Федоренко и др., 2011].

Генетические различия островных и континентальной популяций подтверждаются результатами дисперсионного анализа общего количества трихом (табл. 5). Межпопуляционное несходство вполне очевидно, и оно обусловливается влиянием прежде всего генетического фактора (70,7 %), в качестве которого рассматривается признак «типы трихом». Влияние эпигенетического фактора – локализация популяций (14,9 %) – не менее значимо ($F_{\text{эмпирич.}} = 135,4^{***}$). Оба фактора являются главными источниками изменчивости в исследуемых популяциях.

Важную составляющую в адаптивном процессе фотосинтезирующих организмов, тесно

Таблица 4. Особенности популяционной изменчивости островных и континентальной популяций *A. thaliana* по признаку «типы трихом»

Показатели популяционной изменчивости	Обозначения	Популяции <i>A. thaliana</i>		
		Климецкая (К)	Радколье (Р)	Медвежьегорск (М)
Показатель внутрипопуляционного разнообразия	μ	2,767	2,584	2,698
	s_n	0,010	0,012	0,009
Доля редких морф	h	0,078	0,138	0,101
	s_n	0,003	0,004	0,003
Показатель сходства популяций	Обозначения	К/Р	К/М	Р/М
	r	0,985	0,708	0,990
	s_r	0,002	0,006	0,001
Критерий идентичности	$I(\text{эксп})$	431,9	8579,51	325,6
	$I(\text{табл})$	9,21 при $W = 0,01$; 13,82 при $W = 0,001$ и 2 степенях свободы		

Таблица 5. Результаты дисперсионного анализа количества трихом разного типа в розеточном листе у растений континентальной и островных популяций *A. thaliana*

Варьирование данных	Сумма квадратов отклонений	Число степеней свободы	Дисперсия	Критерий Фишера		Доля влияния фактора, %
				F _{эмпир.}	F _{табл.}	
Типы трихом	15770,9	2	7885,5	637,8***	3,0	70,7
Популяции	3348,1	2	1674,17	135,4***	3,0	14,9
Взаимодействие факторов	1101,8	4	275,4	22,3***	2,4	4,9
Остаточное	2114,2	171	12,4			9,5
Общее	22335,1	179				

Примечание. *** – отличия между F_{эмпир.} и F_{табл.} достоверны при p = 999,9 %.

связанную с выживаемостью, представляет естественный отбор, в частности, стабилизирующая его форма. Эффект действия естественного отбора этой формы в отношении морфологического признака «общее количество трихом» в эпидерме розеточного листа был исследован на основе анализа ранжированных отклонений от средних арифметических их значений. Хорошо известно, что особи, чьи количественные признаки близки к среднепопуляционному (или модальному) значению, отличаются максимальной приспособленностью [Алтухов, 2003]. В популяции Радколье значения частот трихом отстоят дальше от своей средней арифметической. Это отражается в большей крутизне принадлежащих им линейных трендов, и, следовательно, действие стабилизирующего отбора здесь ослаблено (рис. 5). Напротив, в популяциях Климецкой и Медвежьегорской линии тренда, характеризующие частоту трихом, отличаются меньшей крутизной с соответствующим более выраженным эффектом отбора.

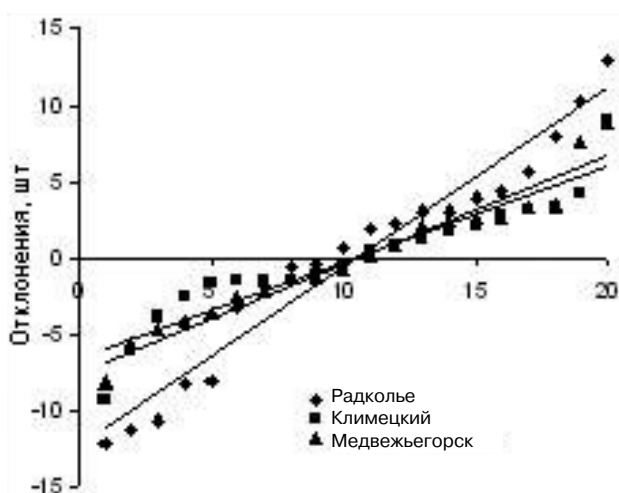


Рис. 5. Общее количество трихом в эпидерме листа у растений континентальной и островных популяций *A. thaliana*, выраженное в отклонениях от их среднеарифметических значений

По оси абсцисс – отклонения, шт. По оси ординат – ранг растений. Параметры линий трендов: Радколье $y = 1,17x - 12,28$, $R^2 = 0,98$; Б. Климецкий $y = 0,63x - 6,53$, $R^2 = 0,88$; Медвежьегорск $y = 0,71x - 7,47$, $R^2 = 0,95$

Рассматривая эти данные как отражение специфического адаптивного состояния, находящегося под контролем естественного отбора (стабилизирующая форма), можно отметить, что стабилизирующий отбор благоприятствует в большей мере растениям популяции Радколье. Тогда как в популяциях Медвежьегорской и Климецкой мы наблюдаем более сильное его действие на формирование того или иного количества трихом в эпидерме розеточного листа растений.

Таким образом, сравнительное морфометрическое исследование опушения листа у растений северных популяций двух видов рода *Arabidopsis* показало их кардинальное различие. В популяции *A. l. petraea* отсутствует опушение листа, что вызвано мутацией в третьем экзоне регуляторного гена *GLA1* [Kivimäki et al., 2007]. Тогда как у растений естественных популяций другого вида, *A. thaliana*, в эпидерме адаксиальной стороны листовых пластинок встречалось три типа трихом: простые, или однолучевые, двухлучевые и трехлучевые. Растения островных (Радколье, Б. Климецкий) и континентальной (Медвежьегорск) популяций характеризовались преобладанием трихом двухлучевого типа и меньшей частотой простых и трехлучевых. Различия по уровню внутривидового варьирования частот трех типов трихом оказались существенными, а межпопуляционные выявились только по частоте двухлучевых трихом. В целом естественные (континентальная и островные) популяции имеют высокий уровень полиморфизма и сходные коэффициенты генетического разнообразия в отношении частоты встречаемости трихом на поверхности розеточного листа. Наиболее высоким варьированием всех типов трихом отличались островные популяции.

Выявленные особенности в характере распределения трихом в целом на лист и по его зонам и различия между растениями островных и континентальной популяций, несомненно, связаны как с генетическими, так и, возможно, с эпигенетическими факторами.

Известно, что инициация того или иного типа трихом, их рост, локализация и количество в эпидерме листа определяются генной регуляцией этих процессов. Она связана с наличием или отсутствием мутаций во многих генах: *GL1*, *TTG1*, *AtMYB23*, *GL2*, *GL3*, *EGL3* и др. [Larkin et al., 1993; Payne et al., 2000; Kirik et al., 2001; Ohashi et al., 2002]. Преобладание на листьях северных популяций *A. thaliana* трихом двухлучевого типа оказалось характерной особенностью, отличающей их от растений линий Columbia и Landsberg, листья которых имеют трихомы только дикого типа, т. е. трехлучевые. Возможно, что растения исследованных нами популяций *A. thaliana* несут мутации, ограничивающие развитие разветвлений трихом. К таким генетическим эффектам приводят, в частности, мутации в генах *ZWI* и *AN*, вызывающие развитие только вильчатых трихом, ограничивая дальнейшее их ветвление в ходе морфогенеза. Мутации в гене *STI* специфически влияют на ветвление трихом, в результате чего трихомы *sti*-мутантов являются неветвящимися [Schnittger, Hülskamp, 2002]. Неправильное развитие трихом, при котором большинство из них не разветвляется, вызывают также и мутации в гене *GL2* [Rerie et al., 1994; Marks, 1997; Ohashi et al., 2002]. С другой стороны, известно, что ветвление трихом связано с сильным влиянием средовой компоненты [Oppenheimer et al., 1997]. Экологические условия северного региона естественным образом влияют как на развитие этих популяций, так и на сложно организованные молекулярно-генетические процессы формирования листа и его эпидермы: неравномерность, продолжительность и характер клеточных делений в базальной, апикальной и маргинальной меристемах; их взаимодействие, направление и скорость дифференциации растущих клеток [Эсау, 1969; Грицких и др., 2009]. Действие естественного отбора, и прежде всего стабилизирующей его формы, определяет и уровень генетического разнообразия, и специфическое адаптивное состояние популяций арабидопсиса [Динамика..., 2004; Соколова, 2009]. Все это формирует отличительные особенности в развитии опушения на поверхности листовой пластинки и в отдельных ее зонах (базальной, апикальной и латеральной), а также характер внутривидового разнообразия по этому признаку в популяциях *Arabidopsis*, находящихся на северной окраине своего ареала. Дальнейшие молекулярно-генетические исследования растений северных популяций

A. thaliana, возможно, позволят более точно установить комплекс генов, участие которых в развитии трихом создает своеобразный северный фенотип *Arabidopsis*.

Литература

- Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431 с.
- Атлас ультраструктуры растительных тканей / Ред. М. Ф. Данилова, Г. М. Козубов. Петрозаводск: Карелия. 1980. 456 с.
- Грицких М. В., Николаевская Т. С., Топчиева Л. В., Федоренко О. М. Генетические и морфофизиологические особенности северных природных популяций *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Труды КарНЦ РАН, сер. Экспериментальная биология. 2009. № 3. С. 38–45.
- Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Ред. Ю. П. Алтухов. М.: Наука, 2004. 619 с.
- Животовский Л. А. Показатели популяционной изменчивости по полиморфным признакам // Фенетика популяций. М.: Наука, 1982. С. 38–44.
- Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1984. 424 с.
- Киселева Н. С., Шелухин Н. В. Атлас по анатомии растений / Ред. С. В. Калишевич. Минск: Вышэйш. школа, 1969. 288 с.
- Лебедева О. Н., Титов А. Ф., Стафеева Е. Б., Николаевская Т. С. О стратегии фотозащиты у высших растений // Доклады РАСХН. 2007, № 4. С. 15–19.
- Соколова Е. И. Мутации и рекомбинации у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // Современные проблемы эволюционной биологии, посв. 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина и 150-летию выхода в свет «Происхождения видов...»: матер. междунар. научно-метод. конф. (Брянск, 12–14 февр. 2009 г). Брянск, 2009. С. 4–8.
- Тутаюк В. Х. Анатомия и морфология растений. М.: Высш. школа, 1980. 317 с.
- Федоренко О. М., Грицких М. В., Топчиева Л. В., Лебедева О. Н. Сравнительный анализ генетической структуры природных популяций двух видов растений *Arabidopsis* с разной степенью панмиксии // Генетика. 2011. Т. 47, № 4. С. 508–515.
- Эсау К. Анатомия растений. М.: Мир, 1969. 564 с.
- Beilstein M. A., Al-Shehbaz I. A., Kellog E. A. Brassicaceae Phylogeny and Trichome Evolution // Amer. J. Bot. 2006. Vol. 93. P. 607–619.
- Clauss M. J., Dietel S., Schubert G., Mitchell-Olds T. Glucosinolate and Trichome Defenses in a Natural *Arabidopsis lyrata* Population // J. Chem. Ecol. 2006. Vol. 32. P. 2351–237.
- Haughn G. W., Somerville C. R. Genetic control of morphogenesis in *Arabidopsis*. 1988. Dev. Genet. Vol. 9. P. 73–89.
- Hauser M.-T., Harr B., Schlötterer C. Trichome Distribution in *Arabidopsis thaliana* and its Close Relative *Arabidopsis lyrata*: Molecular Analysis of the Candidate Gene *GLABROUS1* // Mol. Biol. Evol. 2001. Vol. 18. P. 1754–1763.

Herman P. L., Marks M. D. Trichome Development in *Arabidopsis thaliana*. II. Isolation and Complementation of the *GLABROUS1* Gene // Plant Cell, 1989. Vol. 1. P. 1051–1055.

Gao Y., Gong X., Cao W., Zhao J., Fu L., Wang X., Schumaker K. S., Guo Y. SAD2 in *Arabidopsis* Functions in Trichome Initiation through Mediating GL3 Function and Regulating *GL1*, *TTG1* and *GL2* Expression // J. Integrative Plant Biology. 2008. Vol. 50. P. 906–917.

O'Kane S. L., Al-Shehbaz I. A. Phylogenetic position and generic limits of *Arabidopsis* (*Brassicaceae*) based on sequences of nuclear ribosomal DNA // Ann. Missouri Bot. Gard. 2003. Vol. 90. P. 603–612.

Kirik V., Schnittger A., Radchuk V., Adler K., Hülskamp M., Baumlein H. Ectopic expression of the *Arabidopsis AtMYB23* gene induces differentiation of trichome cells // Dev. Biol. 2001. Vol. 235. P. 366–377.

Kivimäki M., Kärkkäinen K., Caudeul M., Løe G., Egren J. Gene, phenotype and function: *GLABROUS1* and resistance to herbivory in natural populations of *Arabidopsis lyrata* // Mol. Ecol. 2007. Vol. 16. P. 453–462.

Larkin J. C., Oppenheimer D. G., Pollock S., Marks M. D. *Arabidopsis GLABROUS1* gene requires downstream sequences for function // Plant Cell. 1993. Vol. 5. P. 1739–1748.

Larkin J. C., Young N., Prigge M., Marks M. D. The control of trichome spacing and number in *Arabidopsis* // Development. 1996. Vol. 122. P. 997–1005.

Marks M. D. Molecular genetic Analysis of Trichome Development in *Arabidopsis* // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. Vol. 48. P. 137–163.

Ohashi Y., Oka A., Ruberti I., Morelli G., Aoyama T. Entopically additive expression of *GLABRA2* alters the frequency and spacing of trichome initiation // Plant J. 2002. Vol. 29. P. 359–369.

Oppenheimer D. G., Pollok M. A., Vasik J., Szymanski D. B., Ericson B., Feldman K., Marks D. Essential role of a kinesin-like protein in *Arabidopsis* trichome morphogenesis // Developmental Biology. 1997. Vol. 94. P. 6261–6266.

Payne C. T., Zhang F., Lloyd A. M. *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1* // Genetics. 2000. Vol. 156. P. 1349–1362.

Perazza D., Herzog M., Hülskamp M., Brown S., Dorne A.-M., Bonneville J.-M. Trichome Cell Growth in *Arabidopsis thaliana* Can Be Derepressed by Mutations in at Least Five Genes // Genetics Soc. America. 1999. Vol. 152. P. 461–476.

Pesch M., Hülskamp M. Role of TRIPTYCHON in trichome patterning in *Arabidopsis* // BMC Plant Biology. 2011. Vol. 11. P. 603–612.

Rerie W. G., Feldmann K. A., Marks M. D. The *GLABRA2* gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis* // Genes Dev. 1994. Vol. 8. P. 1388–1399.

Schnittger A., Hülskamp M. Trichome morphogenesis: a cell-cycle perspective // Phil. Trans. R. Soc. Lond. 2002. Vol. 357. P. 823–826.

Schwab B., Folkers U., Ilgenfritz H., Hülskamp M. H. Trichome morphogenesis in *Arabidopsis* // Phil. Trans. R. Soc. Lond. 2000. Vol. 355. P. 879–883.

Szymanski D. B., Jilk R. A., Pollock S. M., Marks M. D. Control of *GL2* expression in *Arabidopsis* leaves and trichomes // Development. 1998. Vol. 125. P. 1161–1171.

Szymanski D. *Arabidopsis* Trichome Morphogenesis: A Genetic Approach to Studying Cytoskeletal Function // J. Plant Growth Regul. 2001. Vol. 20. P. 131–140.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Николаевская Татьяна Сергеевна

старший научный сотрудник лаб. генетики
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: nicoltn@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Федоренко Ольга Михайловна

старший научный сотрудник лаб. генетики
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: fedorenko_om@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Nikolaevskaya, Tatiana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nicoltn@mail.ru
tel.: (8142) 573107

Fedorenko, Olga

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: fedorenko_om@mail.ru
tel.: (8142) 573107

УДК 577.322.2 : 546.26 : 54-148

ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ АВТООКИСЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА В ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЯХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ

А. С. Горюнов, А. Г. Борисова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Исследовано воздействие водных нанодисперсий шунгитового углерода и фуллере-
на C_{60} на автоокисление гемоглобина человека *in vitro*. Обнаружено, что концен-
трационно-зависимое окисление железа гема гемоглобина, вызываемое фулле-
реном C_{60} и шунгитовым наноуглеродом в водной дисперсии, не зависит от pH
среды. Анализ путей автоокисления гемовых белков показывает, что наиболее ве-
роятный механизм действия C_{60} и шунгитового углерода на процесс автоокисле-
ния гемоглобина обусловлен их электрон-акцепторными свойствами и связан с не
зависящим от pH переносом электрона с деоксигема на молекулу O_2 , а не с диссо-
циацией супероксид-аниона.

К л ю ч е в ы е с л о в а: гемоглобин, автоокисление, фуллерен, шунгитовый нано-
углерод.

A. S. Goryunov, A. G. Borisova. PROBABLE MECHANISM OF HAEMOGLOBIN AUTOXIDATION IN WATER DISPERSIONS OF CARBON- BASED NANOMATERIALS

The effects of fullerene C_{60} and shungite carbon water nanodispersions on human
haemoglobin autooxidation *in vitro* have been examined. No effect of dispersion pH on
the concentration-dependent ferrous heme oxidation in haemoglobin caused by fullerene
 C_{60} and shungite nanocarbon has been revealed. Heme proteins autooxidation pathways
consideration has shown that the most probable mechanism of C_{60} and shungite carbon
effect on the haemoglobin autooxidation process is determined by their electron-
acceptor capacity and involves a pH-independent transfer of an electron from a
deoxyheme to an O_2 molecule, but not the dissociation of superoxide-anion.

Key words: haemoglobin, autoxidation, fullerene, shungite nanocarbon.

Введение

Быстрое развитие нанотехнологий постоянно повышает вероятность контакта человека и окружающей среды с вновь разработанными наноматериалами, которые проявляют при этом разного рода биологическую активность. Хотя современные представления о токсичности углеродных наночастиц совершенно недостаточны для оценки рисков, имеющиеся ре-

зультаты указывают на то, что возможно повреждающее воздействие при проникновении наночастиц в организм, отдельные органы и системы, ткани, клетки [Sayes et al., 2007; Panessa-Warren et al., 2009; Kumar et al., 2012].

С другой стороны, огромный интерес в последние годы вызывает синтез биоконъюгатов неорганических наночастиц с биомолекулами – такими, как белки и ДНК – в связи с широким разнообразием приложений подобных гибри-

ных материалов во многих областях – от наук о жизни до материаловедения [Aubin-Tam, Hamad-Schifferli, 2008]. Все это определяет огромное значение, которое имеет изучение и описание взаимодействия «белок – наночастица». Уже достаточно убедительно показано, что основные физические и физико-химические характеристики наноматериалов существенным образом влияют на структуру и стабильность белка [Shang et al., 2009]. Имеются данные, свидетельствующие о том, что фуллерен C_{60} оказывает окислительное воздействие на клетки и их компоненты [Colvin, Kulinowski, 2007]. Механизм этого воздействия остается неясным, поскольку в водной среде – водных суспензиях агрегатов C_{60} (агу/н C_{60}) – ни синглетного кислорода, ни супероксид-радикала обнаружено не было [Fei, Perett, 2009].

В предыдущем исследовании [Горюнов и др., 2013] нами было установлено, что наноглерод в водной дисперсии способствует частичному окислению гемового железа в гемоглобине и переходу последнего в функционально неактивную мет-форму. Целью настоящей работы было продолжение исследования этого эффекта для выяснения механизма окислительного воздействия водных дисперсий фуллерена агу/н C_{60} и шунгитового наноглерода (ShC) на молекулы гемоглобина (Hb) и вопроса о том, какого рода окислительно-восстановительная активность проявляется при взаимодействии наноглерода (НУ) с белковыми макромолекулами.

Материалы и методы

Исследования выполнены с использованием приборной базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Особенностью предлагаемого подхода является то, что было исследовано не собственное окислительное воздействие углеродных наночастиц (УНЧ) на белок, а их влияние на уже имеющий место в эритроците окислительно-восстановительный процесс – спонтанное превращение Hb в окси-форму Hb(II) O_2 в физиологически неактивную мет-форму Hb(III) (т. н. автоокисление Hb).

Реакцию автоокисления проводили в растворах гемоглобина с концентрацией $(1,5 - 2) \cdot 10^{-6}$ М (в расчете на гем) в различных буферных системах с известными величинами pH в аэробных условиях при температуре 43 °С. Через установленные промежутки времени спектрофотометрически определяли содержание окси- и метгемоглобина в пробе.

Измерения были выполнены в 0,1 М натрий-ацетатном буфере (pH 5,2–5,6), 0,035 М фосфатном буфере (pH 5,6–7,4) и в 0,1 М трис-буфере (pH 7,4–9,1). Ионная сила была постоянной, составляла 0,1 и регулировалась путем добавления NaCl.

Дисперсии агу/н C_{60} , ShC в различных концентрациях добавлялись в раствор Hb и выдерживались заданное время. Автоокисление Hb в буферном растворе и в дисперсиях УНЧ оценивалось по уровню равновесия структуры Hb между окисленной и восстановленной (мет $\rightleftharpoons$ окси, $Fe^{3+} \rightleftharpoons Fe^{2+}$) формами.

Спектры поглощения белков и наноглерода регистрировались с помощью спектрофотометров Specord M40 (Carl Zeiss, Jena) и СФ-56 (ЛОМО-Спектр, СПб) в кюветах длиной 1 см в характерных интервалах длин волн. Данные по поглощению использовались для определения концентрации, а также для идентификации структурного состояния белка.

Концентрации окси- и метгемоглобина рассчитывали на основании уравнений для спектрофотометрического анализа смесей гемоглобинов [Benesch et al., 1973], в которых используются данные по поглощению на длинах волн 560, 576 и 630 нм. Пользуясь этими уравнениями, рассчитывали концентрацию участников реакции через определенные промежутки времени, затем из начальной скорости реакции автоокисления рассчитывали кажущиеся константы скорости реакции.

Источниками наночастиц углерода были: порошок шунгита I разновидности (месторожд. Шуньга), порошок фуллеренов, содержащий $C_{60}/C_{70} = 83/16$ и около 1 вес. % высших фуллеренов (производства компании «Интеллект», С.-Петербург).

Наноглерод исследовался в форме водных нанодисперсий фуллерена C_{60} и шунгитового углерода. Водная нанодисперсия фуллеренов представляет собой дисперсию нанокластеров – гидратированных комплексов из нескольких десятков молекул C_{60} диаметром 0,7 нм. Размер нанокластеров молекул фуллерена в водной нанодисперсии – 70–100 нм. Шунгитовый наноглерод в водной дисперсии представлен наночастицами (90–100 нм), сформированными из многослойных наноглобул < 10 нм, которые в свою очередь образованы базовыми структурными элементами – непланарными графеновыми фрагментами размером < 1 нм [Рожкова, 2011]. Водные нанодисперсии шунгитового углерода были получены по методике, описанной ранее в работах [Brant et al., 2006; Рожков и др., 2007; Rozhkova et al., 2007; Рожкова, 2011].

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано [Горюнов и др., 2013], что часть молекул окси Hb окисляется достаточно быстро в условиях повышенной температуры, и особенно быстро – при низких значениях pH раствора; так, в среде с pH 5,2 уже в начальный момент измерения содержится некоторое количество окисленного Hb.

На рис. 1 представлены зависимости от времени величины эффекта коллоида фуллерена aq/nC_{60} , т. е. разницы между концентрациями мет Hb в дисперсии с разными концентрациями C_{60} и контролем (без C_{60}): $[\text{мет Hb}]_{\text{C}_{60}} - [\text{мет Hb}]_{\text{K}}$; для сравнения взяты значения pH 5,2 и 7,9.

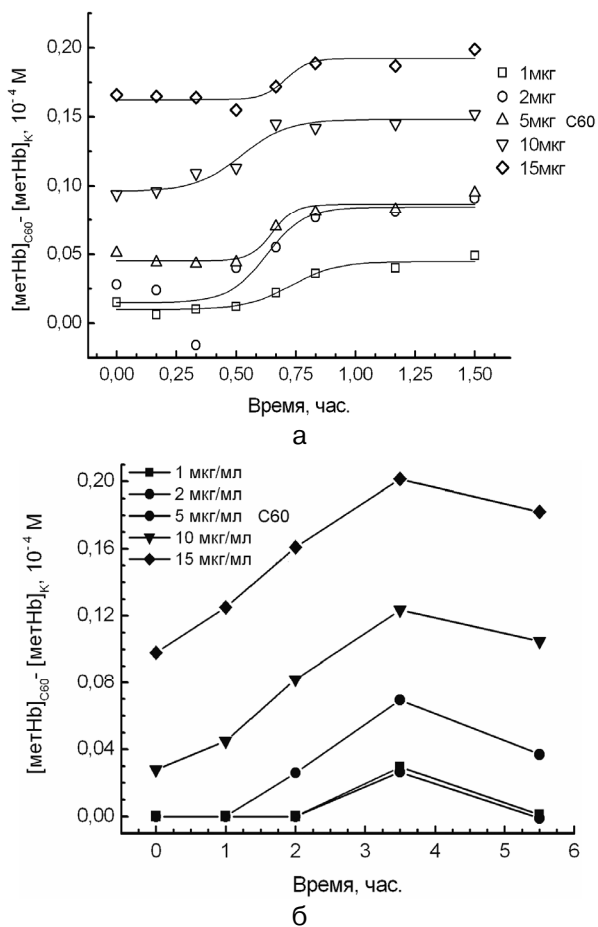


Рис. 1. Кинетические кривые величины эффекта, производимого фуллереном C_{60} (aq/nC_{60}) в нанодисперсии на концентрацию окисленного гемоглобина (мет Hb) при pH 5,2 (а) и pH 7,9 (б). Исходная концентрация оксигемоглобина 1,5 мг/мл

Видно, что имеет место зависимость величины эффекта не только от концентрации C_{60} , но и от времени. Особое значение имеет тот факт, что характер временной зависимости – сигмоидный, с выраженным переходом с одного уровня эффекта на другой. Этот переход-

ный процесс от одного уровня окисления Hb до другого происходит в интервале 30–40 мин. Переход к новому состоянию заканчивается за время около 1 часа, т. к. кривая полностью выходит на плато к данному моменту. Таким образом, это процесс, скорость которого значительно выше, чем самого автоокисления, которое приводит к выходу на плато только за время более 1,5 часа, как это следует из данных по кинетике окисления при pH 5,2 [Горюнов и др., 2013]. Здесь весьма интересно заметить, что именно за время примерно в 1 час устанавливается равновесие и происходит релаксация при адсорбции белка на твердой поверхности [Norde, Giacomelli, 2000]. Зависимости момента перехода (от 31 до 44 мин), продолжительности перехода (от 3 до 7 мин) или амплитуды перехода (ступеньки) (от 0,03 до 0,13 мкг/мл Hb) от концентрации C_{60} не наблюдается (табл.).

Параметры кинетики перехода, обусловленного влиянием aq/nC_{60} в отношении спонтанного окисления гемоглобина в водной нанодисперсии

Концентрация nC_{60} , мкг/мл	Амплитуда перехода, мкг/мл мет Hb	Продолжительность перехода, мин.	Средняя точка перехода, мин.
1	0,034	5,7	44
2	0,062	7,2	40
5	0,041	2,8	39
10	0,130	5,8	31
15	0,030	2,8	43

Иной характер временной зависимости величины эффекта aq/nC_{60} наблюдается при pH 7,9 (см. рис. 1, б). При отсутствии aq/nC_{60} окисление не отмечается в течение первых 3,5 часа эксперимента, и лишь в дальнейшем происходит умеренное, до $0,06 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ мет Hb, окисление.

При концентрации 1 и 2 мкг/мл C_{60} окисление, регистрируемое через 3,5 часа, уже весьма значительно, что однозначно указывает на ускорение процесса окисления железа гема даже в присутствии малых количеств aq/nC_{60} . При 5, 10 и 15 мкг/мл C_{60} наблюдается тот же эффект, что и при pH 5,2, с той лишь разницей, что при pH 7,9 даже для 15 мкг/мл C_{60} , величина эффекта соответствует уровню контроля, имеющему место при pH 5,2. Кроме того, кинетические кривые автоокисления при pH 7,9 для 5, 10 и 15 мкг/мл C_{60} имеют характер, близкий к линейному [Горюнов и др., 2013], что означает неизменность скорости окисления со временем.

При pH 7,9 процесс перехода, выявленный при pH 5,2, не обнаруживается. Имеет место линейная кинетика нарастания эффекта окисления, обусловленного присутствием нанолуглеро-

да, что позволяет определить скорость этого процесса как величину порядка $8,2 \cdot 10^{-10}$ М/с Нб. Скорость не зависит от концентрации C_{60} .

Сигмоидной формы кинетических кривых величины эффекта aqu/nC_{60} не наблюдается, хотя зависимость от времени, т. е. кинетика, имеет место. При этом важной особенностью является то, что основная тенденция при обоих значениях pH – это рост величины эффекта со временем с признаками последующего насыщения: примерно через 1 час при pH 5,2 и примерно через 3,5 часа при pH 7,9.

Все эти особенности, очевидно, связаны не столько с влиянием aqu/nC_{60} на кинетику окисления Нб, сколько с различиями в характере процесса окисления при двух значениях pH, поскольку амплитуды эффектов при pH 5,2 и pH 7,9 близки. Кроме того, при pH 7,9 окисление происходит столь медленно, что количество окисленного мет Нб невозможно зарегистрировать в течение нескольких часов наблюдения как в контроле, так и при малых концентрациях aqu/nC_{60} . В присутствии же 5–15 мкг/мл aqu/nC_{60} это количество существенно возрастает и эффект становится заметен. И все же при pH 7,9 скорость окисления даже в присутствии aqu/nC_{60} остается малой.

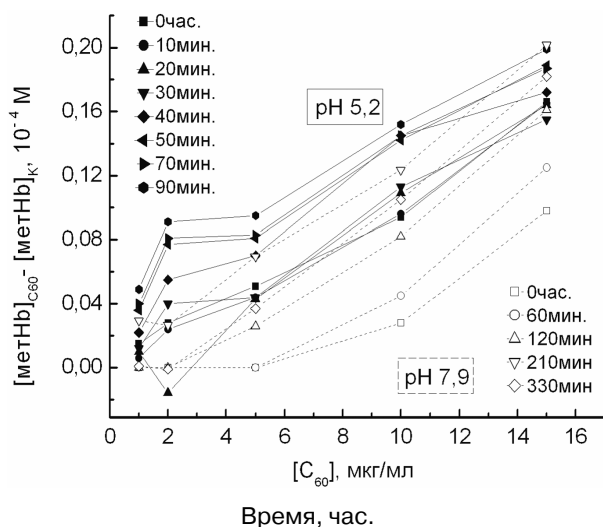


Рис. 2. Зависимости величины эффекта, производимого фуллереном C_{60} (aqu/nC_{60}) в нанодисперсии на концентрацию окисленного гемоглобина (мет Нб), от концентрации (дозы) C_{60} (зависимости «доза – эффект») при pH 5,2 и pH 7,9

На рис. 2 представлены зависимости «доза – эффект», полученные на основании тех же исходных данных (см. рис. 1). Видно, что зависимость от pH имеет место, но она обусловлена тем, что автоокисление вообще не регистрируется при низких концентрациях C_{60} в течение первых часов: нет автоокисления – нет его зави-

симости от концентрации НУ. Это также следует и из зависимостей величины эффекта от времени при разных концентрациях УНЧ. Величина эффекта сильнее зависит от концентрации НУ при pH 7,9, чем при pH 5,2.

Кривые при pH в интервале от 5,2 до 7,9 имеют форму, промежуточную между кривыми при pH 5,2 и pH 7,9.

В присутствии в растворе окси Нб диспергированного ShC концентрация мет Нб также существенно повышалась как при pH 5,2, так и при pH 9,1, причем в прямой зависимости от концентрации ShC [Горюнов и др., 2013], что свидетельствует о его прооксидантном действии. Характер зависимостей для ShC в значительной степени аналогичен тому, который наблюдался для C_{60} и по величине эффекта, и по форме кривых. Различия же состояли в наклоне кривых и, соответственно, скорости реакции окисления Нб.

Для наглядного представления влияния ShC на автоокисление Нб на рис. 3 показаны зависимости разницы между концентрациями мет Нб в дисперсии с разными концентрациями ShC и контролем: $[мет Нб]_{ShC} - [мет Нб]_K$ (величины эффекта ShC).

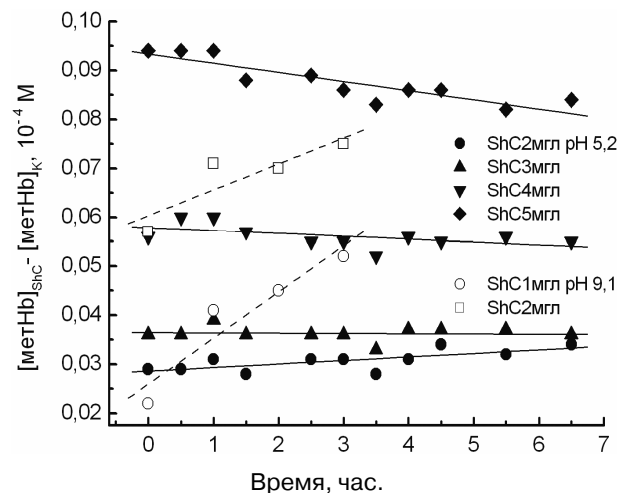


Рис. 3. Кинетические кривые величины эффекта, производимого шунгитовым нанокремнеземом (ShC) на концентрацию окисленного гемоглобина (мет Нб) при pH 5,2 и pH 9,1

Кинетические зависимости эффекта ShC при pH 5,2 уже не имеют сигмообразной формы, но тем не менее свидетельствуют об увеличении эффекта с ростом концентрации НУ. Величина же эффекта очень мало меняется со временем, т. е. находится примерно на одном уровне все время наблюдения. При повышении pH характер кривых меняется, хотя основная особенность – рост эффекта с концентрацией НУ – ос-

тается неизменной. При pH 9,1 кинетические кривые свидетельствуют о монотонном росте эффекта со временем.

На рис. 4 представлены зависимости «доза – эффект», полученные на основании тех же исходных данных (см. рис. 3). Снова наблюдается зависимость от pH, и опять она обусловлена тем, что автоокисление вообще не регистрируется при низких концентрациях ShC в начальный период наблюдения. Тенденция же к увеличению эффекта НУ с увеличением времени наблюдения при pH 5,2 практически отсутствует. При pH 9,1 она проявляется, однако только между начальным моментом и всеми последующими (1, 2, 3 часа), которые между собой отличаются мало. Это указывает на то, что зависимость скорости автоокисления от присутствия ShC несущественна.

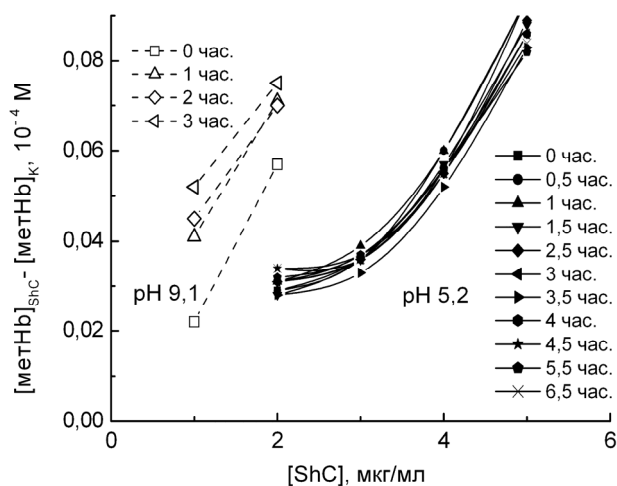


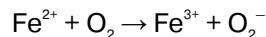
Рис. 4. Зависимости величины эффекта, производимого шунгитовым наноглеродом (ShC) на концентрацию окисленного гемоглобина (мет Hb), от концентрации ShC (зависимости «доза – эффект») при pH 5,2 и pH 9,1

Таким образом, в целом характер эффекта ShC остается таким же, как и aqu/nC₆₀, за исключением сигмоидной формы кинетических зависимостей. Это позволяет предполагать и аналогию механизма воздействия нанодисперсий этих двух форм углерода на процесс окисления Hb.

Важнейшим с точки зрения понимания механизма влияния НУ на автоокисление Hb результатом как для aqu/nC₆₀, так и для ShC является отсутствие зависимости величины эффекта от pH, хотя характер зависимости эффекта от концентрации НУ при разных pH несколько отличается.

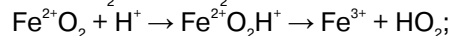
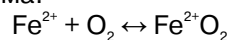
Известно, что метаболизм эритроцитов главным образом направлен на поддержание Hb в ферро-состоянии Fe(II), поскольку свободный гем в растворе очень быстро окисляется в присутствии кислорода до ферри-состоя-

ния. Для гемовых белков, физиологической функцией которых является связывание кислорода, белковая матрица служит для минимизации тенденции гемового железа к окислению. Продуктом окисления гема в ферро-состоянии наряду с ферри-гемом является супероксид-радикал – независимо от механизма, общая схема реакции кислорода с железом ферро-гема – это:

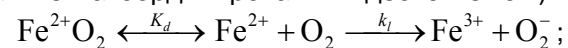


Имеющиеся сведения об автоокислении гемовых белков свидетельствуют о трех возможных путях этого процесса [Gonzalez et al., 1998]:

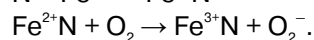
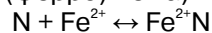
1) диссоциация (или вытеснение растворителем) протонированного супероксида с оксигема:



2) перенос электрона с пентакоординированного деоксигема-посредника (реакция между некоординированной молекулой кислорода и пентакоординированным деоксигемом):



3) перенос электрона с гексакоординированного деоксигема-посредника (реакция между некоординированной молекулой кислорода и посредником, имеющим молекулу воды в шестом координационном положении деокси(ферро)-гема):



В отношении 2-го и 3-го путей в нашем случае особенно важным является то, что перенос электрона (внешней сферы) не зависит от pH в отличие от диссоциации супероксида по 1-му пути.

В действительности, как показывают исследования гем-белков с различными функциями, при автоокислении каждый из этих путей вносит свой определенный вклад. Соотношение же этих вкладов может зависеть от многих факторов, влияющих на автоокисление [Gonzalez et al., 1998]. В целом же известно, что скорость реакции автоокисления зависит от pH среды, температуры, а также от присутствия восстановителей и окислителей.

Поскольку окислительно-восстановительный потенциал пары O_2/O_2^- (–0,33 В) ниже, чем у системы $\text{Hb}^{\text{III}}/\text{Hb}^{\text{II}}$ (–0,046 В), одноэлектронный перенос с Fe^{2+} на свободный O_2 , необходимый для путей 2 и 3, не может быть спонтанным [Antonini et al., 1964]. Эти реакции управляются спонтанным превращением супероксида в перекись водорода: $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ [Shikama, 1990]. Поэтому во всех трех путях автоокисления стадии реакции, ведущие к образованию пероксида, можно считать необрати-

мыми. Именно воздействие pH на самоокисление-самовосстановление супероксида до пероксида является причиной ускорения автоокисления при кислых значениях pH.

Эти представления отличаются от преобладавших ранее объяснений типичного характера изменений вида кинетических кривых автоокисления Hb ускорением этого процесса при понижении pH благодаря облегчению протонирования имидазольной группы дистального гистидина, необходимого для автоокисления ферро-гема [Antonini, Brunori, 1971]. Такое понимание позволяло предполагать, что рассматриваемые нами формы наноуглерода обладают свойством способствовать процессу протонирования дистального гистидина Hb в водной дисперсии и что это свойство играет важную роль в механизме окислительного воздействия нанодисперсии углерода на вводимый в нее Hb. Однако отсутствие зависимости эффекта НУ от pH исключает возможность влияния НУ на этот механизм автоокисления.

Следовательно, вариантом объяснения эффекта НУ на автоокисление Hb, который не зависит от pH, остается воздействие НУ на 2-й и 3-й пути автоокисления, связанные с не зависящим от pH переносом электрона с деоксигема на молекулу кислорода, а не на диссоциацию супероксида, которая зависит от pH. При этом такое воздействие на 2-й и 3-й пути может быть заметно только в том случае, если вклад этих путей в автоокисление довольно значителен. Поэтому полученные данные проливают свет также и на механизм самого автоокисления, а конкретно – на соотношение вкладов различных путей этого процесса. Возможно, именно под действием НУ это соотношение изменяется в пользу 2-го и 3-го путей.

Ярким примером того, как наноструктуры, подобные ShC и C₆₀, способны выступать в качестве окислителя, является обнаруженная недавно окислительно-восстановительная реакция между углеродными нанолуковицами и ферроценом, адсорбированным на их поверхности. В этом случае [Cioffi et al., 2009] ферроцен, в состав которого входит Fe²⁺, выступает в качестве донора электрона, а нанолуковица – в качестве акцептора. Поэтому наиболее вероятный механизм действия наночастиц фуллерена и шунгитового углерода на процесс автоокисления гемоглобина связан с облегчением переноса электрона с деоксигема на молекулу кислорода.

Таким образом, наноуглерод в водной дисперсии вызывает концентрационно-зависимое окисление железа гема и проявляет электрон-

акцепторные свойства, что обуславливает автоокисление гемоглобина по механизму, связанному с не зависящим от pH переносом электрона с деоксигема на молекулу O₂, а не с диссоциацией супероксида.

Выражаем признательность Н. Н. Рожковой (Институт геологии КарНЦ РАН) за предоставленные нанодисперсии шунгитового углерода.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-03-00422).

Литература

- Горюнов А. С., Борисова А. Г., Рожков С. П. и др. Окисление гемоглобина в водных нанодисперсиях углерода // Труды КарНЦ РАН. Экспериментальная биология. 2013. № 3. С. 93–100.
- Рожков С. П., Ковалевский В. В., Рожкова Н. Н. Фуллереносодержащие фазы, получаемые из водных дисперсий наночастиц углерода // Журн. физ. химии. 2007. Т. 81, № 6. С. 952–958.
- Рожкова Н. Н. Наноуглерод шунгитов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 100 с.
- Antonini E., Wyman J., Brunori M. et al. Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins. I. Human hemoglobin // J. Biol. Chem. 1964. Vol. 239. P. 907–912.
- Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands / Frontiers of biology. Vol. 21. North Holland Publishing Company: Amsterdam-London, 1971. P. 152.
- Aubin-Tam M. E., Hamad-Schifferli K. Structure and function of nanoparticle-protein conjugates // Biomed Mater. 2008. Vol. 3, N 3. P. 034001–034017.
- Benesch R. E., Benesch R., Yung S. Equations for the Spectrophotometric Analysis of Hemoglobin Mixtures // Analytical Biochem. 1973. Vol. 55, N 1. P. 245–248.
- Brant J. A., Labille J., Bottero J. Y. et al. Characterizing the impact of preparation method on fullerene cluster structure and chemistry // Langmuir. 2006. Vol. 22. P. 3878–3885.
- Cioffi C. T., Palkar A., Melin F. et al. A carbon nanocation-ferrocene donor-acceptor system: synthesis, characterization and properties // Chemistry. 2009. Vol. 15, N 17. P. 4419–4427.
- Colvin V. L., Kulinowski K. M. Nanoparticles as catalysts for protein fibrillation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104. P. 8679–8680.
- Fei L., Perrett S. Effect of Nanoparticles on Protein Folding and Fibrillogenesis // Int. J. Mol. Sci. 2009. Vol. 10. P. 646–655.
- Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M. A., Rybak-Akimova E. V. et al. Mechanisms of Autooxidation of the Oxygen Sensor FixL and Aplysia Myoglobin: Implications for Oxygen-Binding Heme Proteins // Biochemistry. 1998. Vol. 37. P. 10188–10194.
- Kumar V., Kumari A., Guleria P. et al. Evaluating the toxicity of selected types of nanochemicals // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 2012. Vol. 215. P. 39–121.

Norde W., Giacomelli C. E. BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states // J. Biotechnol. 2000. Vol. 79, N 3. P. 259–268.

Panessa-Warren B. J., Maye M. M., Warren J. B. et al. Single walled carbon nanotube reactivity and cytotoxicity following extended aqueous exposure // Environ Pollut. 2009. Vol. 157, N 4. P. 1140–1151.

Rozhkova N. N., Griбанov A. V., Khodorkovskii M. A. Water mediated modification of structure and physical chemical properties of nanocarbons // Diamond and Related Materials. 2007. Vol. 16. P. 2104–2108.

Sayes C. M., Marchione A. A., Reed K. L. et al. Comparative Pulmonary Toxicity Assessments of C₆₀ Water Suspensions in Rats: Few Differences in Fullerene Toxicity in Vivo in Contrast to in Vitro Profiles // Nano Letters. 2007. Vol. 7, N 8. P. 2399–2406.

Shang W., Nuffer J., Muniz-Papandrea V. et al. Cytochrome c on Silica Nanoparticles: Influence of Nanoparticle Size on Protein Structure, Stability, and Activity // Small. 2009. Vol. 5, N 4. P. 470–476.

Shikama K. Autoxidation of oxymyoglobin: a meeting point of the stabilization and the activation of molecular oxygen // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 1990. Vol. 65. P. 517–527.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Горюнов Андрей Сергеевич

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Борисова Александра Григорьевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: borisova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Goryunov, Andrey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: goryunov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

Borisova, Alexandra

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: borisova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

УДК 5911.144:639.934:[577.161.1+577.161.3]

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛИСИЦ (*VULPES VULPES* L.) И ПЕСЦОВ (*ALOPEX LAGOPUS* L.) ПРИ ВЛИЯНИИ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ВИТАМИНОВ А И Е

**Л. Б. Узенбаева¹, И. В. Баишникова¹, А. Г. Кижина¹, Т. Н. Ильина¹,
В. А. Илюха^{1,2}, Н. Н. Тютюнник¹**

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Петрозаводский государственный университет

При использовании световой микроскопии установлено, что высокие дозы витаминов А и Е неодинаково влияют на морфометрические параметры лимфоцитов периферической крови у лисиц (*Vulpes vulpes* L.) и песцов (*Alopex lagopus* L.), относящихся к отряду хищных (*Carnivora*). Добавка к рациону лисиц витамина А приводит к увеличению размера лимфоцитов. У песцов витамины А и Е вызывают уменьшение параметров гладких форм лимфоцитов, а витамин А, кроме того, – изменения морфологии клеточной поверхности. Наблюдаемые видовые различия в реагировании на высокие дозы витаминов А и Е, по-видимому, зависят от особенностей клеточного гомеостаза и структурно-функциональных свойств мембран лимфоцитов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: лимфоциты, морфометрические параметры, витамин А, витамин Е, лисицы, песцы.

**L. B. Uzenbaeva, I. V. Baishnikova, A. G. Kizhina, T. N. Ilyina, V. A. Ilyukha,
N. N. Tyutyunnik. MORPHOMETRIC PARAMETERS OF PERIPHERAL
BLOOD LYMPHOCYTES IN SILVER (*VULPES VULPES* L.) AND BLUE
(*ALOPEX LAGOPUS* L.) FOXES TREATED WITH VARIOUS DOSES OF
VITAMINS A AND E**

It has been determined by light microscopy that high doses of vitamins A and E have a different effect on the morphometric parameters of peripheral blood lymphocytes in two carnivore species – silver (*Vulpes vulpes* L.) and blue (*Alopex lagopus* L.) foxes. Vitamin A supplementation to the diet of silver foxes increased the size of lymphocytes. Vitamins A and E caused a significant decrease of the morphometric indices of lymphocytes smooth forms, moreover vitamin A also caused changes of the cell surface morphology in blue foxes. The observed species differences in response to high doses of vitamins A and E seem to depend on the features of cellular homeostasis and the structural-functional properties of lymphocyte membranes.

K e y w o r d s: lymphocytes, morphometric indices, vitamin A, vitamin E, silver fox, blue fox.

Введение

Биологически активные соединения, в том числе и витамины, влияют на состояние иммунной системы. На животных моделях и в культуре тканей показано, что витамин А и родственные ретиноиды участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки и функций кроветворных и иммунокомпетентных клеток [Badwey et al., 1986; Webb, Villamor, 2007]. В отношении витамина Е установлено, что он является необходимым компонентом мембран клеток и субклеточных структур и, обладая антиоксидантной и антиапоптотической активностью, в значительной степени обеспечивает их структурно-функциональную стабильность [Утешев и др., 1998; Webb, Villamor, 2007].

Большинство исследований по изучению влияния витаминов на иммунореактивность выполнено на лабораторных животных и на человеке, тогда как сведения, касающиеся других видов млекопитающих, встречаются крайне редко. Представители отряда хищных (*Carnivora*) отличаются рядом биологических особенностей, связанных с экологией, питанием, размножением, сменой волосяного покрова [Туманов, 2003], которыми может определяться специфика обмена и действия жирорастворимых витаминов на иммунитет [Schweigert, Raila, 2002].

Целью настоящей работы было изучение влияния различных доз витаминов А и Е на морфометрические параметры и поверхностную архитектуру лимфоцитов периферической крови у двух представителей отряда хищных (*Carnivora*) – серебристо-черной лисицы, цветовой формы канадской красной лисицы (*Vulpes vulpes* L.) и вуалевого песца, мутантной формы дикого белого песца (*Alopex lagopus* L.).

Материалы и методы

Исследования выполнены с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН.

Изучение влияния витаминов А (масляный раствор ретинола ацетата, Россия) и Е («Сихавит Е 50», Германия) проводили в ноябре на введенных в зоокультуру 6-месячных самках серебристо-черных лисиц и вуалевых песцов. Лисицы были разделены на три группы (по 6 особей): контрольную и две опытные. Животные первой опытной группы получали 10000 МЕ витамина А, второй – 100 мг витамина Е на голову в сутки. Песцы были разделены на пять групп (по 6 особей): контрольную и четыре опытные. Животные первых двух опытных групп получали соответственно 5000 МЕ и 10000 МЕ витамина А, двух

других – соответственно 50 мг и 100 мг витамина Е на голову в сутки. Животные всех групп находились на рационе зверохозяйства, подопытные дополнительно к основному рациону получали витамины с утренней порцией корма в течение 14 дней. Кроме того, в основной рацион в зверохозяйстве добавляли витамин Е в дозе 15 мг на голову в сутки, являющейся нормой для зверей осенью.

Определение относительного содержания и исследование морфологических особенностей лимфоцитов проводили на мазках периферической крови, окрашенных по Паппенгейму. В работе использовали световой микроскоп Axioscop 40 (Carl Zeiss) с цветной цифровой видеокамерой (Pixera 150ES) и компьютерной системой анализа изображений «Видеотест». Морфометрические параметры – размеры лимфоцитов (ядра и клетки), а также доля площади, занимаемой ядром, – определены у 699 лимфоцитов из крови лисиц, а также у 1454 относительно гладких форм лимфоцитов и у 96 лимфоцитов с выростами и сфероидными образованиями из крови песцов.

Помимо морфометрического анализа лимфоцитов в сыворотке крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определяли концентрацию ретинола и α -токоферола [Скурихин, Двинская, 1989].

Полученные данные обрабатывались с использованием пакетов программ MS Excel и Statgraphics общепринятыми методами вариационной статистики. Оценку достоверности различий показателей проводили с применением критериев Вилкоксона–Манна–Уитни и Стьюдента [Коросов, Горбач, 2007]. Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

Результаты и обсуждение

Определение морфометрических параметров – конфигурации и размеров клеточных структур – имеет большое значение для оценки функциональной активности лейкоцитов и характера распределения популяций клеток при диагностике и мониторинге заболеваний, а также при выявлении действия внешней среды на организм [Козинец и др., 2002]. Известно, что лимфоциты периферической крови различаются между собой по размерам и характеру микрорельефа; это, возможно, обусловлено как влиянием различных факторов, так и способом фиксации и методами визуализации [Редчиц, Парфенов, 1989; Гущина и др., 2005; Федорова и др., 2008].

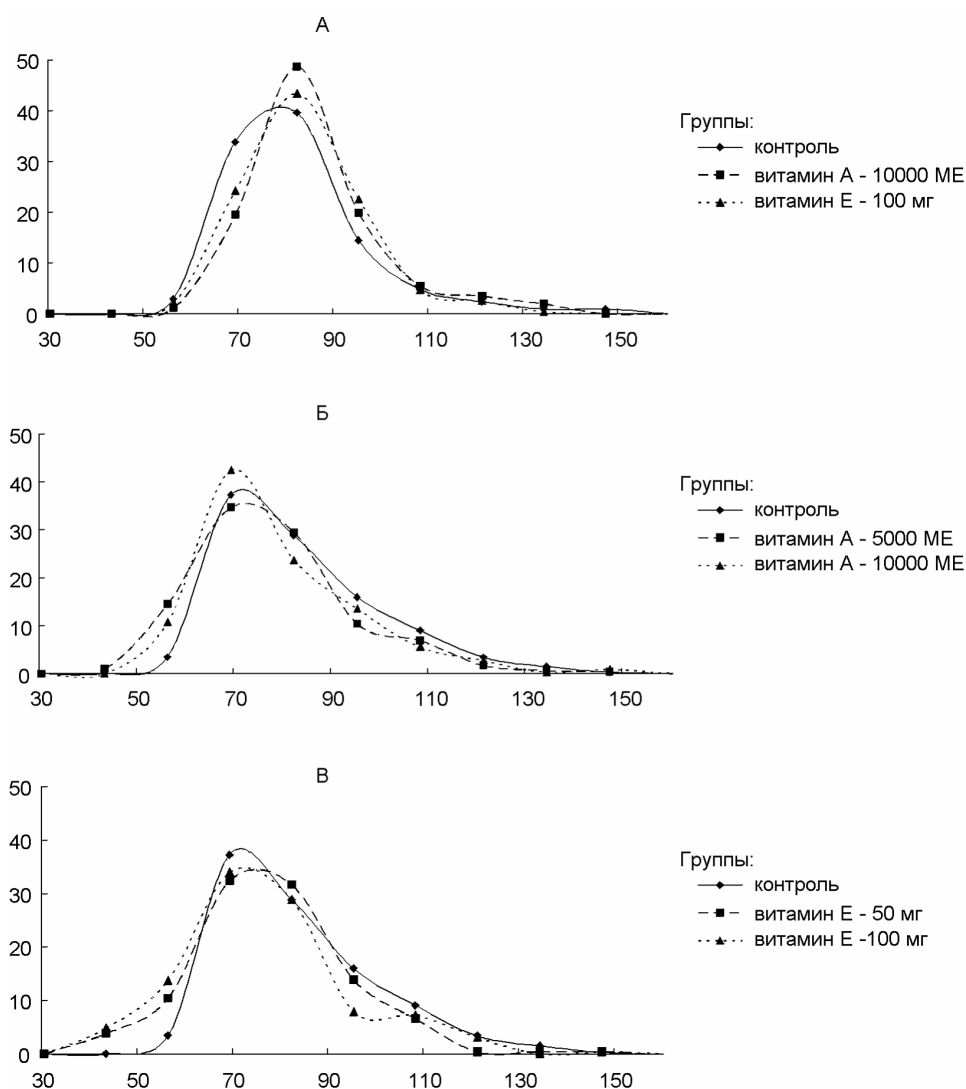


Рис. 1. Гистограмма распределения лимфоцитов по площади у серебристо-черных лисиц (А) и вуалевых песцов (Б и В) при различных дозах витаминов А и Е

По оси абсцисс – площадь (мкм²), по оси ординат – частота встречаемости лимфоцитов (%)

По результатам наших исследований, проведенных на светомикроскопическом уровне на фиксированных препаратах, установлено, что у лисиц и песцов, так же как и у других видов млекопитающих, размер и форма лимфоцитов периферической крови варьируют. Данные об относительном содержании и морфометрических параметрах лимфоцитов представлены в таблицах 1 и 2, а также на рисунке 1, микрофотографии – на рисунке 2.

У лисиц среди лимфоцитов наблюдаются малые или средние с небольшим ободком цитоплазмы клетки, у песцов обнаружена тенденция в сторону увеличения их размера (см. рис. 1). Широкоцитоплазматные гранулярные лимфоциты у этих видов встречаются крайне редко. У лисиц контрольной группы площадь лимфоцитов в среднем равняется $63,10 \pm 1,03 \text{ мкм}^2$, их

ядер – $47,60 \pm 0,56 \text{ мкм}^2$. У песцов она больше и составляет соответственно $70,75 \pm 0,93 \text{ мкм}^2$ и $54,81 \pm 0,54 \text{ мкм}^2$ (см. табл. 1).

Из анализа кривой распределения лимфоцитов по площади следует, что в контрольных группах у лисиц она имеет более симметричный характер, чем у песцов, что свидетельствует об однородности популяции по размеру и преобладании среднецитоплазматных лимфоцитов (см. рис. 1). У песцов по сравнению с лисицами выявлено увеличение количества клеток большего размера, с площадью, превышающей 90 мкм^2 , что соответствует смещению кривой распределения вправо. Таким образом, морфометрические исследования показали: лимфоциты у лисиц и песцов различаются по размеру, что, по-видимому, обусловлено особенностями иммунного гомеостаза этих двух

Таблица 1. Морфометрические параметры лимфоцитов периферической крови серебристо-черных лисиц и вуалевых песцов при различных дозах витаминов А и Е ($M \pm m$)

Параметры	Группа животных				
	Контроль	5000 МЕ витамина А	10000 МЕ витамина А	50 мг витамина Е	100 мг витамина Е
Лисицы					
Площадь клетки, $\mu\text{м}^2$	$63,10 \pm 1,03$		$66,53 \pm 0,87^*$		$64,63 \pm 0,82$
Площадь ядра, $\mu\text{м}^2$	$47,60 \pm 0,56$		$49,52 \pm 0,47^{**}$		$48,80 \pm 0,49$
Площадь, занимаемая ядром, %	$76,64 \pm 0,54$		$75,44 \pm 0,46$		$76,30 \pm 0,46$
Песцы					
Лимфоциты с относительно гладкой поверхностью					
Площадь клетки, $\mu\text{м}^2$	$70,75 \pm 0,93$	$64,91 \pm 1,00^{***}$	$66,18 \pm 0,95^{***}$	$65,57 \pm 1,04^{***}$	$63,61 \pm 1,01^{***}$
Площадь ядра, $\mu\text{м}^2$	$54,81 \pm 0,54$	$49,84 \pm 0,66^{***}$	$50,39 \pm 0,54^{***}$	$49,04 \pm 0,68^{***}$	$47,98 \pm 0,58^{***}$
Площадь, занимаемая ядром, %	$78,55 \pm 0,37$	$77,63 \pm 0,37$	$77,36 \pm 0,38^*$	$75,62 \pm 0,42^{***}$	$76,84 \pm 0,46^{**}$
Лимфоциты с выростами и сфероидными образованиями					
Площадь клетки, $\mu\text{м}^2$	$89,88 \pm 6,07^{\circ\circ}$	$67,40 \pm 2,30$	$65,88 \pm 1,49$	$71,53 \pm 25,72$	$83,13 \pm 4,51^{\circ\circ\circ}$
Площадь ядра, $\mu\text{м}^2$	$61,70 \pm 3,96$	$50,14 \pm 1,45$	$48,65 \pm 1,01$	$46,57 \pm 16,70$	$57,95 \pm 2,60^{\circ\circ\circ}$
Площадь, занимаемая ядром, %	$68,74 \pm 1,52^{\circ\circ\circ}$	$74,93 \pm 0,85^{\circ\circ}$	$74,14 \pm 0,87^{\circ\circ\circ}$	$65,13 \pm 0,08^{\circ\circ\circ}$	$70,29 \pm 1,58^{\circ\circ\circ}$

Примечание. Различия между группами достоверны: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем; $^{\circ\circ}$ – $p < 0,01$; $^{\circ\circ\circ}$ – $p < 0,001$ по сравнению с относительно гладкими формами лимфоцитов в каждой группе.

видов отряда хищных, отличающихся экологической специализацией.

Согласно литературным данным, в зависимости от морфологии лимфоциты на ультраструктурном уровне подразделяют на несколько групп – относительно гладкие, с выростами (фибриллярными, ламеллярными, бульбарными) и с углублениями [Козинец и др., 2002; Новицкий и др., 2005]. Если в покое у лимфоцитов наблюдается относительно гладкая поверхность, то при активации и повреждении от-

мечено появление различных морфологических типов. В частности, обнаружено, что их архитектура изменяется при патологии, причем некоторые состояния сопровождаются увеличением количества клеток со сфероидными образованиями, что коррелирует с усилением Т-клеточного пролиферативного ответа [Новицкий и др., 2005].

Наши данные показали, что лимфоциты у лисиц, за редким исключением, имеют относительно гладкую поверхность (см. рис. 2, а–в).

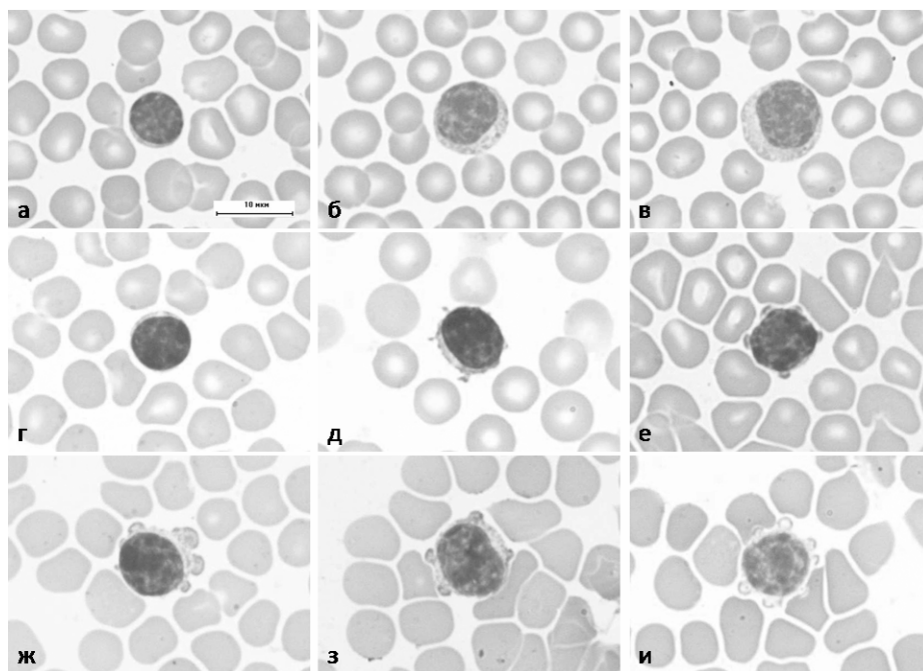


Рис. 2. Периферическая кровь серебристо-черной лисицы (а–в) и вуалевых песца (г–и):

лимфоциты с относительно гладкой поверхностью (а–г), с тонкими нитевидными структурами (д), с выростами и сфероидными образованиями (е–и). Окраска по Паппенгейму. Масляная иммерсия, об. 100, ок. 10

Таблица 2. Количество лимфоцитов в периферической крови серебристо-черных лисиц и вуалевых песцов при различных дозах витаминов А и Е (%)

Показатели	Группа животных				
	Контроль	5000 МЕ витамина А	10000 МЕ витамина А	50 мг витамина Е	100 мг витамина Е
Лисицы					
	Общее содержание				
M ± m Lim	36,33 ± 8,02 16–67		45,33 ± 5,16 29–62		40,00 ± 1,86 32–45
Песцы					
	Общее содержание				
M ± m Lim	53,17 ± 4,76 44–73	49,00 ± 2,50 44–60	53,67 ± 3,43 46–69	42,83 ± 5,67 29–60	51,50 ± 4,97 31–66
	С выростами и сфероидными образованиями				
M ± m Lim	0,58 ± 0,40 0–2,5	2,25 ± 0,91 0,5–6,5	2,83 ± 1,95 0–12,5	0,08 ± 0,08 0–0,5	0,67 ± 0,25 0–1,5

У песцов они в основном представлены относительно гладкими формами (см. рис. 2, г), реже – с цитоплазматическими выростами (см. рис. 2, е–и) и в единичных случаях – с очень трудно различимыми в световом микроскопе нитевидными структурами (см. рис. 2, д). По характеру рельефа у песцов из общей популяции выделяются лимфоциты с одним или несколькими достаточно большими цитоплазматическими выпячиваниями. Исходя из морфологических признаков и по аналогии с электронно-микроскопическими исследованиями [Козинец и др., 2002], мы отнесли их в группу лимфоцитов, содержащих выросты и сфероидные образования (см. табл. 1).

Цитоплазматические выпячивания придают лимфоцитам пузырчатый вид с отчетливо выраженной базофилией на периферии клетки. Количество выростов и сфероидных образований колеблется от 1 до 6 на один лимфоцит, их величина составляет в среднем от 0,73 до 8,95 % от общей площади клетки. По величине параметров, характеризующих форму клеток, этот тип лимфоцитов близок к эллипсу, причем цитоплазматические выпячивания увеличивают изрезанность периметра и, за некоторым исключением, увеличивают размер, что, вероятно, отражает наличие запаса клеточного объема и возможности его регуляции [Редчиц, Парфенов, 1989; Скоркина и др., 2011].

Введение в рацион лисиц и песцов высоких доз витаминов А и Е приводит к изменению морфометрических параметров лимфоцитов, но существенно не влияет на их относительное содержание в периферической крови (см. табл. 1 и 2). Появление групп клеток с иными размерами и показателями внутриклеточного метаболизма может свидетельствовать о популяционной перестройке в иммунной системе [Ватазин и др., 2009]. Отсутствие влияния витаминов на общее количество, по-видимому, обусловлено преимущественно ре-

гуляцией функций различных типов лейкоцитов. В частности, в экспериментах показано, что витамин А вызывает увеличение активности естественных киллеров и освобождение супероксид-аниона нейтрофилами, а токоферол способствует редукции супероксид-аниона и ослаблению биоцидности лейкоцитов. Кроме того, выявлено, что на эффективность действия витаминов влияет ряд факторов, таких как состояние организма, возраст, доза, продолжительность введения и наличие патологии [Webb, Villamor, 2007].

Влияние высоких доз витаминов А и Е на морфометрические параметры лимфоцитов неодинаково у лисиц и песцов. Если у песцов добавка витаминов приводит к уменьшению размера гладких форм лимфоцитов, то у лисиц, напротив, витамин А достоверно, а токоферол несущественно его увеличивают. Об изменении внутривидового соотношения лимфоцитов в крови у животных, получавших витамины, свидетельствует смещение кривых распределения их по площади (см. рис. 1). В некоторых работах отмечено стимулирующее влияние бета-каротина, являющегося предшественником витамина А, на рост тимуса и количество малых лимфоцитов [Chew, Park, 2004]. Уменьшение площади и нарушение структуры мембран эритроцитов, увеличение содержания атипичных форм – сфероцитов и стоматоцитов выявлено при экспериментальном гипервитаминозе А у самцов крыс линии Вистар [Минашкина, 2011].

Хроматографический анализ показал, что при нагрузке витамином А изменение морфометрических параметров лимфоцитов как у лисиц, так и у песцов происходит на фоне существенного повышения в сыворотке крови содержания ретинола и, как правило, снижения концентрации токоферола. При добавках витамина Е изменения менее значительны и заключаются в повышении уровня

ретинола у песцов, получавших витамин в дозе 100 мг. В предыдущих исследованиях установлено, что у лисиц ткань селезенки, крупнейшего периферического лимфоидного органа, имеет самое низкое содержание токоферола и является более чувствительной по сравнению с печенью, почками, сердечной и скелетной мышцами, а также легкими к высокой дозе витамина А [Баишникова, Сергина, 2010].

Конфигурация лимфоцитов у лисиц при нагрузке большими дозами витамина А не изменяется, а у песцов увеличивается количество клеток с выростами и сфероидными образованиями цитоплазмы (см. рис. 2, е–и). Различий формы и размера ядра в зависимости от морфологии поверхности клетки не выявлено. Однако за счет выростов изменяется ядерно-цитоплазматическое соотношение в сторону увеличения площади лимфоцитов и, соответственно, уменьшения доли ядра. У песцов, получавших витамин Е, аналогичное изменение морфологии лимфоцитов наблюдается так же, как и у контрольных, в единичных случаях. Хотя в содержании лимфоцитов со сфероидными образованиями достоверных различий между исследованными группами не выявлено, у песцов, находящихся на рационах с добавкой витамина А, частота встречаемости их больше (см. табл. 2).

Особенности поверхностной архитектоники клеток крови могут зависеть от дезорганизации структуры плазматической мембраны вследствие как активационных, так и апоптотических процессов [Новицкий и др., 2005; Инжутова, 2007]. Например, при инкубации нейтрофилов человека с полностью-транс-ретинолом и, в меньшей степени, с другими ретиноидами наблюдается образование многочисленных выростов клеточной поверхности и выделение супероксид-аниона [Badwey et al., 1986]. Согласно литературным данным, их формирование, так называемый блеббинг, является обратимым процессом, сопровождающим апоптоз [Инжутова, 2007]. Причем показано, что ретиноевая кислота может индуцировать апоптоз Т-лимфоцитов [Toth et al., 2011]. В исследуемых нами образцах крови фигур апоптоза и признаков автоматизации клеточных фрагментов, как правило, не обнаружено.

Исходя из данных литературы, многие химические и физические факторы, вызывающие апоптоз, индуцируют свободнорадикальные реакции [Утешев и др., 1998]. У песцов, получавших витамин А, увеличение количества лимфоцитов с цитоплазматическими выпячиваниями может определяться большей чувстви-

тельностью мембран к его влиянию или способностью в высоких концентрациях оказывать прооксидантное действие [Меньщикова и др., 2008]. Так, при изучении взаимодействия ретиналя с плоскими бислойнными липидными мембранами был сделан вывод о том, что аккумулированный в этих мембранах ретиналь оказывает фотодеструктивное действие как на мембранные белки, так и на липидную компоненту, окисляя ненасыщенные липиды [Соколов и др., 2008]. Проявлением мембранотропного действия является увеличение количества лизосомальных энзимов в сыворотке и в лейкоцитах крови кроликов после инъекций ретинола [Schmidt et al., 1992].

Имеются данные, что между песцом, типичным представителем полярных животных, и лисицей, обитающей в умеренных широтах, наблюдается ряд физиолого-биохимических различий, которые, в частности, проявляются в величине критических температур и термо-нейтральной зоны [Klir, Heath., 1992]. Выявлено, что у человека метаболическая адаптация к климатогеографическим факторам Севера сопровождается накоплением в мембранах клеток липидов и перестройкой фосфолипидов, делающих мембрану более стабильной [Севостьянова, 2013]. Можно предположить, что мембраны лимфоцитов у песцов и лисиц также имеют особенности в расположении липидов, с чем, вероятно, связана разница в реакции этих клеток на высокие дозы витаминов. Например, сравнительное изучение спермы этих видов животных показало, что в составе плазматических мембран соотношение незамещенных и замещенных жирных кислот и уровень десмо-стерола и холестерина у лисиц выше, чем у песцов [Miller et al., 2005].

Учитывая результаты наших исследований и данные литературы, можно предположить, что изменение морфологии клеточной поверхности у животных, содержащихся на рационах с высокими дозами витамина А, связано с влиянием ретинола на мембраны. В наших экспериментах влияние витамина А на морфологию поверхности лимфоцитов обнаружено не у всех исследованных животных, что свидетельствует об индивидуальной чувствительности. Кроме индивидуальных имеются и видовые различия, обусловленные особенностями метаболизма, соотношением про-, антиоксидантных и ряда других факторов, обеспечивающих адаптацию животных к среде обитания. В частности, есть сведения о неодинаковой чувствительности к ретиноидам нейтрофилов морской свинки и

человека [Badwey et al., 1986]. В реакции на добавки витаминов у серебристо-черной лисицы и вуалевого песца большое значение могут иметь особенности экологической специализации видов – канадской красной лисицы и дикого белого песца, давших начало исследованным мутантным формам.

Выводы

Таким образом, у лисиц и песцов при действии высоких доз ретинола и токоферола наблюдаются межвидовые различия морфометрических параметров лимфоцитов периферической крови. У лисиц витамин А достоверно увеличивает размеры клеток и не влияет на их поверхностную архитектуру. У песцов витамины А и Е приводят к уменьшению морфометрических параметров лимфоцитов, а витамин А вызывает также у некоторых из них изменение морфологии клеточной поверхности – формирование цитоплазматических выростов и сфероидных образований. Наблюдаемые особенности, по-видимому, обусловлены неодинаковой видовой чувствительностью к добавкам высоких доз витаминов и могут зависеть от физико-химического состояния мембран лимфоцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента НШ-1642.2012.4, ФЦП ГК № 02.740.11.0700 и проекта № 68 в рамках сотрудничества РАН и Польской АН.

Литература

- Баишникова И. В., Сергина С. Н. Влияние высокой дозы витамина А на антиоксидантную систему песцов и лисиц // Естественные науки. Астраханский государственный университет. 2010. № 1 (30). С. 55–69.
- Ватазин А. В., Василенко И. А., Валов А. Л., Метелин В. Б., Круглов Е. Е., Цалман А. Я. Витальная компьютерная морфометрия лимфоцитов в диагностике острого отторжения почечного аллотрансплантата // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2009. Том XI, № 4. С. 18–25.
- Гущина Ю. Ю., Плескова С. Н., Звонкова М. Б. Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 2005. № 1. С. 48–53.
- Инжутова А. И., Салмина А. Б., Петрова М. М., Михуткина С. В., Народова В. В., Домрачев Д. В. Регистрация блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови как экспресс-метод оценки тяжести состояния больных осложненными формами гипертонической болезни // Бюл. СО РАМН. 2007. № 1 (123). С. 6–10.
- Козинец Г. И., Погорелов В. М., Шмаров Д. А., Боев С. Ф., Сазонов В. В. Клетки крови – современные технологии их анализа. М.: Триада-Фарм, 2002. 535 с.
- Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных: Метод. пособие. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2007. 76 с.
- Меньщикова Е. Б., Зенков Н. К., Ланкин В. З., Бондарь И. А., Труфакин В. А. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
- Минашкина Т. А. Морфологическая характеристика эритроцитов при экспериментальном гипервитаминозе А // Морфология. 2011. Т. 139, № 2. С. 41–44.
- Новицкий В. В., Наследникова И. О., Рязанцева Н. В., Токарева Н. В., Белобородова Э. И., Дунаева Л. Е., Белобородова Е. В., Антошина М. А., Белоконов В. В., Жукова О. Б. Лимфоциты при хроническом вирусном гепатите С: поверхностная архитектура, микровязкость мембраны и функциональная активность // Бюл. СО РАМН. 2005. № 3 (117). С. 78–82.
- Редчиц Е. Г., Парфенов А. С. Реологические свойства лейкоцитов и их участие в микроциркуляции крови // Гематол. и трансфузиол. 1989. Т. 34, № 12. С. 40–45.
- Севостьянова Е. В. Особенности липидного и углеводного метаболизма человека на Севере (литературный обзор) // Бюл. сибирской мед. 2013. Т. 12, № 1. С. 93–100.
- Скоркина М. Ю., Федорова М. З., Муравьев А. В. Цитоархитектоника лимфоцитов здоровых доноров в условиях активации и блокады β -адренорецепторов // Ярославский педагогический вестник. 2011. Т. III, № 3. С. 104–109.
- Скурихин В. Н., Двинская Л. М. Определение α -токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии // С.-х. биология. 1989. № 4. С. 127–129.
- Соколов А. В., Соколов В. С., Фельдман Т. Б., Островский М. А. Взаимодействие полностью-транс-ретинола с бислойными липидными мембранами // Биологические мембраны. 2008. Т. 25, № 6. С. 499–507.
- Туманов И. Л. Биологические особенности хищных млекопитающих России. СПб.: Наука, 2003. 448 с.
- Утешев Д. Б., Сергеев А. В., Утешев Б. С. Апоптоз: Фармакологические аспекты // Эксперим. и клинич. фармакол. 1998. Т. 61, № 4. С. 57–65.
- Федорова М. З., Павлов Н. А., Зубарева Е. В., Надеждин С. В., Симонов В. В., Забияков Н. А., Тверитина Е. С. Использование атомно-силовой микроскопии для оценки морфометрических показателей клеток крови // Биофизика. 2008. Т. 53, вып. 6. С. 1014–1018.
- Badwey J. A., Robinson J. M., Curnutte J. T., Karnovsky M. J., Karnovsky M. L. Retinoids Stimulate the Release of Superoxide by Neutrophils and Change Their Morphology // J. Cell. Physiol. 1986. Vol. 127. P. 223–228.
- Chew B. P., Park J. S. Carotenoid Action on the Immune Response // J. Nutr. 2004. Vol. 134. P. 257–261.

Klir J. J., Heath J. E. Metabolic rate and evaporative water loss at different ambient temperatures in two species of fox: the red fox (*Vulpes vulpes*) and the arctic fox (*Alopex lagopus*) // Comp. Biochem. Physiol. 1992. Vol. 101A, N 4. P. 705–707.

Miller R. R. Jr., Cornett C. L., Waterhouse K. E., Farstad W. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation // Cryobiology. 2005. Vol. 51. P. 66–75.

Schmidt M., Kotataj A., Bulla J., Krol T., Witek B., Banasik A. Activity of Some Lysosomal Enzymes in Plasma and Leucocytes of Rabbits Exposed to Effect of Retinol and Hydrocortisone // Horm. metab. 1992. Vol. 24. P. 21–25.

Schweigert F. J., Raila J. Mechanisms Involved in the Intestinal Digestion and Absorption of Dietary Vitamin A // J. Nutr. 2002. Vol. 132. P. 324.

Toth K., Sarang Z., Scholtz B., Brazda P., Ghyselinck N., Chambon P., Fesus L., Szondy Z. Retinoids enhance glucocorticoid-induced apoptosis of T cells by facilitating glucocorticoid receptor-mediated transcription // Cell Death Differ. 2011. Vol. 18, N 5. P. 783–792.

Webb A. L., Villamor E. Update: Effects of Antioxidant and Non-Antioxidant Vitamin Supplementation on Immune Function // Nutr. Rev. 2007. Vol. 65, N 5. P. 181–217.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Узенбаева Людмила Борисовна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
тел.: (8142) 573107

Баишникова Ирина Валерьевна

ведущий биолог
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: iravbai@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Кижина Александра Геннадьевна

главный биолог
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: golubewa81@yandex.ru
тел.: (8142) 573107

Ильина Татьяна Николаевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ilyina@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Илюха Виктор Александрович

зав. лаб. экологической физиологии животных, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ilyukha@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Тютюнник Николай Николаевич

главный научный сотрудник, д. с.-х. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: tyutyunnik@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Uzenbaeva, Lyudmila

Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
tel.: (8142) 573107

Baishnikova, Irina

Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: iravbai@mail.ru
tel.: (8142) 573107

Kizhina, Alexandra

Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: golubewa81@yandex.ru
tel.: (8142) 573107

Ilyina, Tatiana

Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ilyina@bio.krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

Ilyukha, Victor

Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ilyukha@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

Tyutyunnik, Nikolay

Institute of Biology, Karelian Research Center,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: tyutyunnik@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

УДК 577.115 : 597.541(268.46)

ЛИПИДНЫЙ СТАТУС БЕЛОМОРСКОЙ СЕЛЬДИ *CLUPEA PALLASI MARISALBI* BERG ДВИНСКОГО ЗАЛИВА БЕЛОГО МОРЯ В ОСЕННИЙ СЕЗОН

С. Н. Пеккоева, С. А. Мурзина, З. А. Нефедова, Т. Р. Руоколайнен,
П. О. Рипатти, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Проведена сравнительная оценка физиолого-биохимического состояния на уровне липидного и жирнокислотного статуса беломорской сельди *Clupea pallasii marisalbi* Berg (*Clupeidae*), выловленной в Двинском заливе Белого моря в 2010 и 2012 годах (осень). Установлено, что сельдь 2012 года достоверно отличалась от таковой 2010 года содержанием суммарных липидов за счет фосфолипидов (фосфатидилэтанолamina, лизофосфатидилхолина, фосфатидилинозитола). Несмотря на различия гидрохимических условий (глубина, температура воды, соленость) в местах вылова в 2010 и 2012 годах, сельдь не различалась уровнем триацилглицеринов и суммарных моноеновых жирных кислот, на количественный и качественный состав которых влияет кормовая база и температурный режим. Получены новые данные по триацилглицеринам и жирнокислотным спектрам общих липидов у беломорской сельди из Двинского залива, отличающиеся доминирующим содержанием моноеновых жирных кислот (до 41,4 % от суммы), которые следует рассматривать как эколого-биохимическую особенность липидов беломорской сельди в осенний сезон и адаптацию на биохимическом уровне к специфическим трофо-экологическим условиям (температура, соленость, течения, спектр кормовых объектов и др.) пелагиали Белого моря.

К л ю ч е в ы е с л о в а: беломорская сельдь, липиды, жирные кислоты, биохимическая адаптация, Двинский залив.

S. N. Pekkoeva, S. A. Murzina, Z. A. Nefyodova, T. R. Ruokolainen,
P. O. Ripatti, N. N. Nemova. LIPID STATUS OF THE WHITE SEA
HERRING *CLUPEA PALLASI MARISALBI* BERG FROM DVINA BAY OF
THE WHITE SEA IN AUTUMN

A comparative study of the physiological and biochemical status within the lipid and fatty acid profile of the White Sea herring *Clupea pallasii marisalbi* Berg, caught in Dvina Bay of the White Sea in the autumn of 2010 and 2012, was made. It was found that the level of total lipids differed significantly between the fish collected in 2010 and 2012, primarily due to phospholipids (phosphatidylethanolamine, lysophosphatidylcholine, and phosphatidylinositol). Despite the variations in the hydrochemical conditions (depth, water temperature, salinity) of the catch locations in 2010 and 2012, no differences in the herrings' level of triacylglycerols and monoenoic fatty acids, which quantitative and qualitative composition is affected by the forage resources and temperature conditions, were observed. New data on triacylglycerols and the fatty acid spectrum of total lipids of the herring from Dvina Bay, showing the distinguishing prevalence of monoenoic fatty acids (up to 41.1 % of the total lipids), which should be considered as ecological and biochemical features of lipids characteristic of the White Sea herring and a biochemical

adaptation to the specific trophoecological conditions of the White Sea pelagic part (temperature, salinity, currents, food items range, etc.), were collected.

Key words: The White Sea herring, lipids, fatty acids, biochemical adaptation, Dvina Bay.

Введение

Локальные стада беломорской малопо-звонковой сельди *Clupea pallasii marisalbi* Berg (*Clupeidae*), одного из ценных промысловых видов рыб Белого моря, приурочены к жизни в различных участках моря, существенно отличающихся друг от друга условиями гидрологического режима [Кузнецов, 1960; Белое море..., 1995; Бергер, 2007]. Двинский залив, подверженный влиянию мощного потока пресных вод р. Сев. Двина, характеризуется наиболее сложным распределением гидрохимических и гидрологических параметров среди других заливов Белого моря [Биологические ресурсы..., 2012]. Известно, что популяционная структура беломорской сельди точно не определена и является предметом многочисленных дискуссий [Душкина, 1975; Белое море..., 1995; Семенова и др., 2004; Евсеенко и др., 2006; Бергер, 2007; Мишин и др., 2008]. В пределах Двинского залива выделяют две формы сельди: малочисленное стадо самой мелкой сельди – устьянки, обитающей в предустьевых пространствах Сев. Двины, и стадо мелкой двинской сельди, распространенное у Летнего берега и в других частях залива [Рыбы..., 1958]. Биохимические маркеры, в том числе и липиды, могут быть важны не только при изучении механизмов биохимической адаптации гидробионтов, исследовании передачи вещества и энергии по пищевым цепям, но являются не менее значимыми в определении популяционной структуры вида наряду с молекулярно-генетическими показателями [Андрияшева, 2011; Мурзина и др., 2012].

Липиды, и особенно их жирнокислотные компоненты, достаточно быстро включаются в приспособительные реакции организма: регуляцию жидкости мембран, изменение активности мембраносвязанных ферментов, синтез биологически активных веществ типа простагландинов, лейкотриенов и других [Лось, 2001; Tocher, 2003]. Условия существования незначительно сказываются на наборе определенных типов липидов, что подтверждает их генетическую детерминированность [Крепс, 1981]. При этом количест-

венное содержание липидов в организме отражает экологические особенности жизни рыб, а данные о сезонной, популяционной и межгодовой изменчивости позволяют оценить их значение в разные периоды жизненного цикла [Сидоров, 1983]. Изучение вариабельности липидов под влиянием комплекса специфических экологических факторов среды Двинского залива позволит проследить их роль в адаптационных биохимических механизмах организма.

Следует отметить, что данные по липидному и жирнокислотному составу беломорской сельди могут быть полезны при использовании этого вида рыб в коммерческих целях.

Настоящая работа начата в 2010 году [Murzina et al., 2013b] и посвящена сравнительной оценке физиолого-биохимического состояния на уровне липидного и жирнокислотного статуса беломорской сельди *Clupea pallasii marisalbi* Berg Двинского залива Белого моря в осенний сезон.

Материалы и методы

С помощью биохимических методов определен качественный и количественный липидный и жирнокислотный состав взрослых особей беломорской сельди, выловленных в осенний сезон (октябрь) в 2010 и 2012 годах из двух участков Двинского залива Белого моря, различающихся гидрологическими условиями (табл. 1). В качестве материала для исследований послужили тушки взрослых особей беломорской сельди. Оценка липидного и жирнокислотного статуса была проведена по содержанию общих липидов (ОЛ), триацилглицеринов (ТАГ), общих фосфолипидов (ФЛ), холестерина (ХС), эфиров холестерина (ЭХС), а также жирных кислот (ЖК) суммарных липидов.

Таблица 1. Географическое положение и гидрологические параметры мест сбора проб беломорской сельди *Clupea pallasii marisalbi* Berg

Показатели/период	Октябрь 2010	Октябрь 2012
Координаты	64°57' с. ш. 38°23' в. д.	64°54' с. ш. 40°00' в. д.
Глубина, м	50,0	13,0
Температура воды, °С	6,5	8,4
Соленость, ‰	26,5	18,8

Выделение липидов из зафиксированного материала проводили по методу Фолча смесью хлороформ-метанол (2:1 по объему) [Folch et al., 1957]. Суммарные липиды фракционировали на пластинках «Silufol» 150 x 150 мм («Avalier», Чехословакия) в системе растворителей: петролейный эфир – диэтиловый эфир – уксусная кислота (90:10:1 по объему) при комнатной температуре [Шталь, 1965]. Для количественного определения общих фосфолипидов, холестерина, триацилглицеринов, эфиров холестерина использовали гидроксаматный метод [Сидоров и др., 1972]. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 540 нм. Интенсивность окраски комплекса прямо пропорциональна количеству образовавшихся гидроксаматных производных. Количественное определение холестерина проводили по методу Ф. Энгельбрехта с использованием трихлоруксусного железа, растворенного в хлорной кислоте [Engelbrecht et al., 1974]. Интенсивность образовавшейся окраски измеряли на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 550 нм.

Определение фосфолипидного состава методом высокоэффективной жидкостной хроматографии проводили на жидкостном хроматографе «Стайер» (ООО «Аквилон») с компьютерным обеспечением. Обработка хроматограмм проводилась при помощи программы для хроматографа (ООО «Аквилон»). Соотношение между компонентами оценивали по величине площадей пиков на хроматограмме. Идентификацию пиков проводили по образцам стандартных фосфолипидов: фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидилиназитол (ФИ), фосфатидилхолин (ФХ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин (СФМ).

Для определения спектра ЖК общих липидов использовали метод газожидкостной хроматографии. Полученные метиловые эфиры ЖК разделяли на хроматографе «Хроматэк Кристалл-5000.1» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором, с капиллярными колонками фирмы Phenomenex, USA: Zebron ZB-FFAP (внутренний диаметр 0,32 мм и длина 50 м, толщина слоя жидкой фазы 0,50 мкм), в качестве подвижной фазы служил азот, скорость потока газа – 50 мл/мин. Количественное определение ЖК проводили с помощью внутреннего стандарта – определенного количества бегеновой кислоты (22:0), добавляемой к раствору липидов. Идентификацию ЖК осуществляли сравнением хроматографических подвижностей имеющих на хроматограмме пиков (времени удерживания и логарифмических индексов) с таковыми для стандартных

ЖК, при этом использовали стандартные растворы метиловых эфиров ЖК («Supelco»). Обработку хроматограмм проводили с использованием компьютерной программы «Хроматэк Аналитик». Работа проведена на базе лаборатории экологической биохимии с использованием оборудования ЦКП ИБ КарНЦ РАН.

Результаты были обработаны с применением общепринятых методов вариационной статистики [Ивантер, Коросов, 2010]. Статистический анализ проводили с использованием пакета Excel и компьютерной программы Statgrafics 2.5 для Windows. Достоверность различий между липидными показателями у рыб из различных мест обитания оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа One Way Analysis of Variance (ANOVA). Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$ [Коросов, Горбач, 2007]. Данные в таблицах и рисунках представлены в виде $M \pm m$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что уровень ОЛ у беломорской сельди Двинского залива в осенний сезон был сравнительно высоким, при этом у сельди 2012 года вылова он был больше, чем у сельди 2010 года (41,6 и 34,5 % сухого вещества соответственно). Известно, что одним из приспособлений рыб высоких широт является способность накапливать большое количество липидов за счет активного питания в течение наиболее продуктивного весенне-летнего периода [Cossins, Prosser, 1978; Falk-Petersen et al., 1987; Lund, Sidell, 1992; Аракелова и др., 2004; Falk-Petersen, 2007]. В осенний сезон, период окончания нагула, сельдь содержит максимальное количество липидов, которые обеспечивают оптимальную работу метаболических процессов рыб в условиях ограниченного поступления пищи зимой. Различие в содержании ОЛ у беломорской сельди 2010 и 2012 годов вылова связано, вероятнее всего, с гидрологическими и трофо-экологическими особенностями мест сбора проб. Превалирование содержания ОЛ у сельди в 2012 году было преимущественно связано с ФЛ, уровень которых был выше, чем у сельди, выловленной в 2010 году (23,4 и 19,1 % соответственно) (табл. 2).

Известно, что Двинский залив подвержен влиянию мощного потока пресных вод р. Сев. Двины, вследствие чего он характеризуется наиболее сложным распределением гидрохимических и гидрологических параметров [Биологические ресурсы..., 2012]. Сток Сев. Двины имеет очень большое тепляющее и опресняющее влияние на прилегающие воды Двинского

залива, он переходит в самое сильное и устойчивое течение Белого моря – Двинское (место сбора проб в 2012 году) [Рыбы..., 1958; Перцова, Пантюлин, 2005]. Для большей части залива (место сбора проб в 2010 году) характерна стратификация вод и небольшая скорость течения. Основную часть года верхние слои имеют температуру выше, чем нижележащие, а их соленость увеличивается с глубиной [Рыбы..., 1958]. Выявленные различия суммарных ФЛ (за счет ФЭА, ФИ и ЛФХ) у беломорской сельди Двинского залива в 2010 и 2012 годах вылова указывают на участие именно мембранных липидов в компенсаторных реакциях организма рыб к действию преимущественно абиотических факторов среды (стратификация, скорость течения, соленость, температура) в сложившихся экологических условиях обитания. Адаптивная роль отдельных классов ФЛ у экотермных организмов весьма разнообразна, как по регулируемой ими функции, так и по механизму действия. Установлено, что среди доминирующих ФЛ у исследуемой сельди 2010 и 2012 годов вылова были ФХ (16,1 и 14,1 % сухого вещества соответственно) и ФЭА (0,6 и 1,9 % сухого вещества соответственно), причем по уровню ФХ различия не были достоверны, а метаболически связанные с фосфатидилхолином ФЭА и ЛФХ были достоверно выше у сельди в 2012 году (см. табл. 2). Однако последняя отличалась пониженным уровнем ФИ по сравнению с таковым у сельди 2010 года вылова. Количественные вариации ненасыщенных мембранных фосфолипидов (ФЭА, ФИ) влияют на активность мембранных ферментов, например комплекса Na^+ , K^+ -АТФазы, работа которого связана с осморегуляцией, что имеет значение при изменении условий среды обитания (соленость, давление, температура), и являются приспособительной реакцией мембранных липидов организма [Schuurmans Stekhoven, Bonting, 1981; Болдырев, 1985; Болдырев и др., 2006]. При этом ФИ является одним из сигнальных липидов в клетках самых различных типов, и особенно важна его роль в развитии нервной системы организма. Ранее было установлено, что количественные вариации ФИ показаны у люмпена пятнистого (*Leptoclinus maculatus*) из разных мест обитания, отличающихся соленостью и температурой воды [Murzina et al., 2013a]. В данном исследовании обращает на себя внимание значительное повышение ЛФХ в липидах сельди 2012 года вылова по сравнению с таковым у рыб 2010 года (4,2 и 0,6 % соответственно). Известно, что значительное повышение ЛФХ (выше оптимального уровня) в органах и тканях

может происходить при различных патологических состояниях организма [Грибанов, 1991; Осадчая и др., 2004]. Лизофосфолипиды обладают свойством лабильнолизировать мембраны и увеличивать их проницаемость для небольших по размерам молекул. Более того, изменение количества ЛФХ, как и ФИ, в клеточных мембранах происходит под воздействием наружных сигналов (например, при колебании температуры и солености). При этом ЛФХ может участвовать в поддержании структуры мембраны и быть одним из вторичных мессенджеров при передаче сигнала через рецепторы плазматической мембраны, обеспечивая тем самым оптимальные условия для работы мембраносвязанных ферментов [Проказова и др., 1998; Кулагина и др., 2004]. Возможно, увеличение уровня ЛФХ у сельди в 2012 году связано не только с повышенной температурой и опреснением устьевой части Двинского залива за счет стока Сев. Двины, но и с поступлением в речном потоке со сточными водами промышленных предприятий ряда загрязняющих веществ, оказывающих токсическое воздействие на организм рыб. По комплексным оценкам, вода на данном участке реки характеризовалась как «очень загрязненная» [Обзор..., 2012].

Таблица 2. Содержание общих липидов и их отдельных классов (% сухого вещества) у беломорской сельди *Clupea pallasii marisalbi* Двинского залива ($M \pm m$)

Показатель/период вылова	Октябрь 2010	Октябрь 2012
n	20	20
ОЛ	34,5 ± 0,6	41,6 ± 1,1*
ФЛ	19,1 ± 1,3	23,4 ± 1,4*
ФИ	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,0*
ФС	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,0
ФЭА	0,6 ± 0,1	1,9 ± 0,3*
ФХ	16,1 ± 1,1	14,1 ± 0,7
ЛФХ	0,6 ± 0,1	4,2 ± 0,6*
СФМ	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Неизвестные	0,4 ± 0,1	2,1 ± 0,5*
ТАГ	14,1 ± 1,2	16,7 ± 1,2
ЭХС	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2
ХС	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2
ХС/ФЛ	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01

Примечание. n – число проб; ФЛ – фосфолипиды; ФИ – фосфатидилиназитол; ФС – фосфатидилсерин; ФЭА – фосфатидилэтаноламин; ФХ – фосфатидилхолин; ЛФХ – лизофосфатидилхолин; СФМ – сфингомиелин; ТАГ – триацилглицерины; ЭХС – эфиры холестерина, ХС – холестерин. Здесь и в табл. 3 * над средним значением липидного показателя указывает на достоверность отличий ($p \leq 0,05$) данных по годам.

Установлено, что у беломорской сельди Двинского залива в 2010 и 2012 годах вылова показатель ХС/ФЛ не различался и составлял 0,05 (см. табл. 2). Стабильность этого показателя

теля в результате варьирования суммарных ФЛ (за счет отдельных их классов) у сельди Двинского залива может указывать на функцию одного из биохимических механизмов адаптации, направленных на поддержание целостности биомембран и обеспечение оптимальной активности мембраносвязанных ферментов, в ответ на изменения гидробиологических условий обитания в разных местах Двинского залива.

Высокое и относительно стабильное содержание ТАГ у сельди Двинского залива в 2010 и 2012 годах вылова свидетельствует об обеспеченности рыб пищей и создании энергетических резервов на период зимовки. Также не выявлено достоверных различий в уровне ЭХС и ХС у рыб в эти годы. Известно, что по периферии Двинского течения в вершине Двинского залива биомасса фитопланктона достигает значительных величин, соответствующих таковым в период летнего пика развития фитопланктона, что может быть обусловлено более высоким уровнем биогенных элементов, приходящих с мощным речным стоком [Ильяш и др., 2011]. Липиды, синтезируемые на начальных звеньях трофической цепи, в дальнейшем передаются организмам более высоких трофических уровней, где они накапливаются и принимают важное участие в метаболизме. Жизненный цикл беломорской сельди, как и других планктоноядных морских рыб, коррелирует с жизненным циклом его основного объекта питания – зоопланктона.

Таким образом, в основе механизма адаптации беломорской сельди Двинского залива к различным абиотическим факторам в местах сбора проб в 2010 и 2012 годах лежат вариации уровня отдельных классов структурных ФЛ – ФИ, ФЭА и ЛФХ.

Количественный и качественный состав жирнокислотных компонентов липидов рыб тесно связан с трофоэкологическими условиями жизни гидробионтов, такими как качественный и количественный состав пищи, доступность, температура, фотопериод, гидробиологические условия места обитания. В жирнокислотном спектре общих липидов беломорской сельди в 2010 и 2012 годах вылова доминировали МНЖК (41,4 и 41,3 % суммы ЖК соответственно), высокий уровень которых характерен обычно для гидробионтов северных широт [Graeve et al., 2001; Petursdottir et al., 2008; Arts et al., 2009; Murzina et al., 2013b]. Среди МНЖК рыб преобладали 18:1(n-9), 16:1(n-7) и 18:1(n-7) ЖК. Доля 18:1(n-9) достоверно не различа-

лась в исследуемых вариантах, а уровень 16:1(n-7) и 18:1(n-7) ЖК был достоверно выше у сельди 2010 года вылова (табл. 3). Уплотнение биомембран за счет МНЖК происходит более компактно по сравнению с ПНЖК, у которых из-за изогнутости цепей упаковка менее плотная, что имеет адаптивное значение [Cossins, Prosser, 1978; Hochachka, Somero, 2002; Рабинович и др., 2007; Рабинович, 2008]. Значительная часть жирнокислотных компонентов липидов у рыб поступает непосредственно из пищи и отражает видовой состав кормовых объектов [Robin, 1995; Сущик, 2008].

Динофитовые и диатомовые микроводоросли вносят основной вклад в биомассу фитопланктона Белого моря [Ильяш и др., 2011] и являются одним из кормовых объектов беломорской сельди, особенно в период цветения. Отмечается периодичность в продуктивности этих групп водорослей в Белом море, включая сезонность цветения фитопланктона в пределах даже одного залива. Фитопланктон, а также бактериальное сообщество характеризуются сильно выраженной спецификой жирнокислотного состава, на чем основывается теория «трофических биомаркеров». Известно, что 16:1(n-7) ЖК является биомаркером диатомовых водорослей, а 18:1(n-9) – динофитовых водорослей [Viso, Marty, 1993; Viron et al., 2000; Grave et al., 2008]. В этих видах водорослей содержатся и ПНЖК: 20:5(n-3) ЖК – в диатомовых водорослях, 18:4(n-3) и 22:6(n-3) ЖК – в динофлагеллятах, и считаются их биомаркерами [Kattner et al., 1989; Wold et al., 2007; Graeve et al., 2008]. Глубина и температура влияют на количество и доступность пищевых объектов в разные сезоны года. Более того, на пространственное распределение биомассы фитопланктона существенное влияние оказывают гидродинамические процессы. По результатам недавних исследований установлено, что в конце лета вклад динофлагеллят в суммарную биомассу снижался с глубиной и в слоях ниже термоклина доминировали диатомовые водоросли [Ильяш и др., 2011]. Последнее, по-видимому, обусловлено оседанием диатомей, заканчивающих вегетацию в поверхностных слоях. Наши исследования показали, что уровень 16:1(n-7) был выше, а 18:4(n-3) – ниже у сельди в 2010 году, и это указывает на преобладание в питании диатомовых водорослей в осенний сезон в Двинском заливе в 2010 году, когда температура была ниже, а соленость выше по сравнению с 2012 годом (см. табл. 1).

Таблица 3. Содержание отдельных жирных кислот (% суммы ЖК) беломорской сельди *Clupea pallasii marisalbi* Двинского залива Белого моря в осенний сезон ($M \pm m$)

ЖК/период	Октябрь 2010	Октябрь 2012
n	19	20
12:0	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,0
14:0	10,5 ± 0,4	8,1 ± 0,4*
15:0	0,9 ± 0,0	0,7 ± 0,0*
16:0	21,7 ± 0,5	22,7 ± 0,5
17:0	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,0*
18:0	2,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1*
20:0	0,9 ± 0,0	1,2 ± 0,1*
24:0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0*
Сумма НЖК	37,1 ± 0,8	36,5 ± 0,7
14:1(n-5)	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0*
16:1(n-9)	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,2*
16:1(n-7)	11,3 ± 0,3	9,5 ± 0,2*
16:1(n-5)	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0*
17:1(n-7)	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0*
18:1(n-9)	19,8 ± 0,4	20,9 ± 0,5
18:1(n-7)	4,1 ± 0,3	3,3 ± 0,1*
18:1(n-5)	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,0
20:1(n-11)	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0
20:1(n-9)	1,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1*
20:1(n-7)	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0*
22:1(n-11)	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,3
22:1(n-9)	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0
22:1(n-7)	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0
24:1(n-9)	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,0*
Сумма МНЖК	41,4 ± 0,8	41,3 ± 0,7
16:2(n-9)	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
18:2(n-9)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
20:2(n-9)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
22:2(n-9)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Сумма (n-9) ПНЖК	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,04*
16:2(n-7)	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0*
18:2(n-7)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0*
Сумма (n-7) ПНЖК	0,2 ± 0,0	0,6 ± 0,0
16:2(n-6)	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0*
18:2(n-6)	1,3 ± 0,0	0,9 ± 0,0*
18:3(n-6)	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
20:2(n-6)	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0
20:4(n-6)	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0*
Сумма (n-6) ПНЖК	3,5 ± 0,2	2,3 ± 0,1*
18:3(n-3)	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0
18:4(n-3)	1,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1*
20:4(n-3)	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0
20:5(n-3)	6,5 ± 0,5	5,9 ± 0,5
22:6(n-3)	5,3 ± 0,5	6,5 ± 0,5
Сумма (n-3) ПНЖК	15,1 ± 1,2	16,9 ± 1,1
Сумма ПНЖК	21,5 ± 1,4	22,2 ± 1,2
Сумма ЖК	100	100
(n-6)ПНЖК/(n-3)ПНЖК	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0*
18:3(n-3)/18:2(n-6)	0,6 ± 0,0	0,9 ± 0,0*
16:0/18:1(n-9)	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,0

Примечание. n – число проб, ЖК – жирные кислоты, НЖК – насыщенные жирные кислоты, МНЖК – моновенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты. В пробах также содержались 16:3(n-6); 20:3(n-6); 22:5(n-6); 22:2(n-6); 22:3(n-6); 22:4(n-6); 16:2(n-4); 16:3(n-4); 18:3(n-4); 18:4(n-4); 16:3(n-3); 20:3(n-3); 22:3(n-3); 22:4(n-3); 22:5(n-3); 16:4(n-1); 18:5(n-3) жирные кислоты, уровень которых был незначителен.

Одним из компонентов кормовой базы сельди, особенно в летний сезон, является *Calanus glacialis* – веслоногий ракообразный, относящийся к доминирующим видам зоо-

планктона водных экосистем высоких широт. Известно, что в организме только этих копепод синтезируются *de novo* 20:1(n-9) и 22:1(n-11) ЖК [Falk-Petersen et al., 1990; Graeve et al., 2001, 2008], которые у сельди осенью являются минорными (табл. 3). При этом уровень 20:1(n-9) ЖК у сельди в 2010 году был выше в 2,5 раза по сравнению с таковым в 2012 году (см. табл. 3).

Насыщенные жирные кислоты (36,5–37,1 % суммы ЖК) занимают второе место после МНЖК, в них преобладают 16:0 и 14:0 ЖК. При этом выявлены вариации в уровне 14:0 ЖК и минорных 15:0, 18:0, 17:0, 20:0, 24:0 (см. табл. 3). Относительно высокий уровень отдельных НЖК связан не только с синтезом *de novo*, но и с их накоплением за счет питания сельди фито- и зоопланктоном, наличие которого в разных участках Белого моря различалось.

У сельди, выловленной в разных местах Двинского залива, в 2010 и 2012 годах уровень суммарных ПНЖК достоверно не различался и был в пределах 21,5–22,2 % суммы ЖК, среди которых преобладали 20:5(n-3) и 22:6(n-3) кислоты (см. табл. 3). Наибольший интерес представляет биомаркерная минорная 18:4(n-3) кислота, о роли которой было сказано выше.

Большое значение при адаптации рыб к меняющимся условиям среды имеет оптимальное соотношение жирнокислотных радикалов в липидах, определяемое в основном ЖК-составом пищевых объектов, а также способностью самого организма модифицировать его к определенным условиям. Особую роль при этом играет соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК, определяющее такие свойства биомембран, как вязкость и жидкость, обеспечивающие нормальный ход обменных процессов в клетке. Установлено, что показатель 16:0/18:1(n-9) ЖК, характеризующий интенсивность обмена липидов, не изменялся у сельди из разных участков Двинского залива в 2010 и 2012 годах, несмотря на различающиеся условия обитания.

Таким образом, количественные и качественные вариации липидного и жирнокислотного состава у сельди из сравниваемых мест могут быть отражением стратегий биохимических адаптаций, направленных на компенсацию липидного метаболизма у рыб в разных трофо-экологических условиях обитания в Белом море.

Выражаем глубокую благодарность к. б. н. А. В. Семушину (Северный филиал научно-исследовательского института морского рыбного хозяйства и океанографии – СевПИРО, Архангельск) за ценные консультации на этапе выполнения полевой части работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-1410.2014.4, РФФИ (грант № 14-04-00473-а), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН на 2012–2014 гг. «Живая природа» (№ г. р. 01201262107), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН на 2014–2016 гг. «Поисковые фундаментальные научные исследования в интересах развития Арктической зоны Российской Федерации», проект «Эколого-биохимическая характеристика устойчивости гидробионтов Арктической зоны России в условиях изменения климата».

Литература

- Андряшева М. А. Генетические аспекты разведения сиговых рыб. СПб.: ФГНУ ГосНИОРХ, 2011. 639 с.
- Аракелова Е. С., Чеботарева М. А., Забелинский С. А. О совместном влиянии природных температур и трематод на жирнокислотный состав липидов у *Littorinasaxatilis* (Olivi, 1792) (*Gastropoda, Prosobranchia*) // Журнал общей биологии. 2004. Т. 65, № 3. С. 271–277.
- Белое море. Биологические ресурсы и проблемы их рационального использования // Исследования фауны морей: сб. ст.: в 2 ч. СПб.: ЗИН РАН, 1995. Т. 42(50). Ч. 1. 250 с.; ч. 2. 250 с.
- Бергер В. Я. Продукционный потенциал Белого моря // Исследования фауны морей. СПб.: ЗИН РАН, 2007. Т. 60 (68). 292 с.
- Биологические ресурсы Белого моря: изучение и использование // Исследования фауны морей. СПб.: ЗИН РАН, 2012. Т. 69 (77). 377 с.
- Болдырев А. А., Кяйвярйнен Е. И., Илюха В. А. Биомембранология: учебное пособие. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2006. 226 с.
- Болдырев А. А., Прокопьева В. Д. Как регулируется активность мембранных ферментов // Биологические науки. 1985. № 3. С. 5–13.
- Грибанов Г. А. Особенности структуры и биологическая роль лизофосфолипидов // Вопр. мед. химии. 1991. Т. 37, № 4. С. 2–16.
- Душкина Л. А. Пигментация личинок морских сельдей рода *Clupea* на ранних стадиях развития в связи с вопросами динамики численности // Биология беломорской сельди. Л.: Наука, 1975. С. 227–254.
- Евсеев С. А., Андрианов Д. П., Мишин А. В., Наумов А. П. Видовой состав и распределение ихтиопланктона Белого моря в июле 2003 г. // Вопросы ихтиологии. 2006. Т. 46, № 5. С. 672–685.
- Ивантер Э. В., Коросов А. В. Элементарная биометрия: учеб. пособие. Петрозаводск: Изд-во Петргу, 2010. 104 с.
- Ильяш Л. В., Радченко И. Г., Шевченко В. П., Лисин А. П., Пака В. Т., Буренков В. И., Новигатский А. Н., Чульцова А. Л., Пантюлин А. Н. Пространственное распределение фитопланктона Белого моря в конце лета в связи со структурной динамикой вод // Океанология. Морская биология. 2011. Т. 51, № 6. С. 1054–1063.
- Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных. Петрозаводск, 2007. 76 с.
- Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адапционная функция липидов. СПб.: Наука, 1981. 339 с.
- Кузнецов В. В. Белое море и биологические особенности его флоры и фауны. М.: Изд-во АН СССР, 1960. 322 с.
- Кулагина Т. П., Шевченко Н. А., Архипов В. И. Влияние судорожной активности на липиды гомогената, нейрональных и глиальных ядер коры головного мозга крыс // Биохимия. 2004. Т. 69, вып. 10. С. 1404–1409.
- Лось Д. А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 163–198.
- Мишин А. В., Евсеев С. А., Евдокимов Ю. В. О видовом составе и распределении летнего ихтиопланктона губы Чупа (Кандалакшский залив Белого моря) // Вопросы ихтиологии. 2008. Т. 48, № 6. С. 844–850.
- Мурзина С. А., Нефедова З. А., Немова Н. Н. Влияние жирных кислот (маркеров пищевых источников рыб) на механизмы адаптации в условиях высоких широт (Обзор) // Труды КарНЦ РАН. 2012. № 2. С. 18–25.
- Обзор загрязнения окружающей среды на территории деятельности ФГБУ «Северное УГМС» за 2011 год. Росгидромет: Архангельск, 2012. 186 с.
- Осадчая Л. М., Галкина О. В., Ещенко Н. Д. Влияние коразола на активность Na⁺, K⁺-АТФазы и интенсивность ПОЛ в нейронах и нейроглии // Биохимические и молекулярно-биологические основы физиологических функций. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2004. Вып. 37. С. 220–226.
- Перцова Н. М., Пантюлин А. Н. Связь фауны веслоногих рачков (*Copepoda, Calanoida*) Белого и Баренцева морей и механизмы независимости беломорских популяций // Зоологический журнал. 2005. Т. 84, № 8. С. 948–956.
- Проказова Н. В., Звездина Н. Д., Коротаева А. А. Влияние лизофосфатидилхолина на передачу трансмембранного сигнала внутрь клетки // Биохимия. 1998. Т. 63, вып. 1. С. 38–46.
- Рабинович А. Л. Температурная зависимость конформационных свойств олигомерных цепей природных липидов: компьютерное моделирование // Биофизика. 2008. Т. 53, вып. 3. С. 426–433.
- Рабинович А. Л., Корнилов В. В., Балабаев Н. К., Леермакерс Ф. А., Филиппов Ф. В. Свойства бисловых ненасыщенных фосфолипидов: влияние холестерина // Биологические мембраны. 2007. Т. 24, вып. 6. С. 490–505.
- Рыбы Белого моря / Ред. К. А. Алтухов и др. Петрозаводск: Гос. изд-во Карельской АССР, 1958. 162 с.
- Семенова А. В., Андреева А. П., Карпов А. К. и др. Генетическая изменчивость сельдей рода *Clupea* Белого моря // Вопросы ихтиологии. 2004. Т. 44, № 2. С. 207–217.
- Сидоров В. С. Экологическая биохимия рыб. СПб.: Наука, 1983. 240 с.

Сидоров В. С., Лизенко Е. И., Болгова О. М., Неведова З. А. Липиды рыб. 1. Методы анализа. Тканевая специфичность ряпушки *Coregonus albula* L. // Лососевые (*Salmonidae*) Карелии. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1972. Вып. 1. С. 152–163.

Суцук Н. Н. Роль незаменимых жирных кислот в трофометаболических взаимодействиях в пресноводных экосистемах (обзор) // Журнал общей биологии. 2008. Т. 69, № 4. С. 299–316.

Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. М., 1965. 54 с.

Arts M. T., Brett M. T., Kainz M. J. (eds.). Lipids in Aquatic ecosystems // Springer, 2009. 377 p.

Cossins A. R., Prosser C. L. Evolutionary adaptation of membranes to temperature // Proceedings of National Academy of Sciences of USA. 1978. Vol. 75(4). P. 2040–2043.

Engelbrecht F. M., Mari F., Anderson J. T. Cholesterol determination in serum. A rapid direction method // S. A. Med. J. 1974. Vol. 48, N 7. P. 250–356.

Falk-Petersen S., Hopkins C. C. E., Sargent J. R. Trophic relationships in the pelagic, arctic food web // Proc. 24th European marine biology symposium. 1990. P. 315–333.

Falk-Petersen S., Timofeev S., Pavlov V., Sargent J. R. Climate variability and possible effect on arctic food chains. The role of *Calanus* // Arctic-alpine ecosystems and people in a changing environment. Berlin: Springer Verlag, 2007. P. 147–166.

Falk-Petersen S., Sargent J. R., Tande K. S. Lipid composition of zooplankton in relation to the sub-arctic food web // Polar Biol. 1987. N 8. P. 5–120.

Folch J., Lees M., Sloan-Syanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue (for brain, liver and muscle) // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497–509.

Graeve M., Dauby P., Scailteur Y. Combined lipid, fatty acid and digestive tract content analyses: a penetrating approach to estimate feeding model of Antarctic amphipods // Polar biology. 2001. Vol. 24. P. 853–862.

Graeve M., Lundberg M., Boer M., Kattner G., Hop H., Falk-Petersen S. The fate of dietary lipids in the Arctic ctenophore *Mertensia ovum* (Fabricius, 1780) // Marine Biology. 2008. N 153. P. 643–651.

Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. New York: Oxford University press, 2002. 466 p.

Iverson S. J., Arts M. T., Brett M. T., Kainz M. J. (eds.). Tracing aquatic food webs using fatty acids: from qualitative indicators to quantitative determination. In Lipids in aquatic ecosystems; Springer: NY, USA, 2009. P. 281–309.

Kattner G., Hirche H. J., Krause M. Spatial variability in lipid composition of calanoid copepods from Fram Strait, the Arctic // Marine Biology. 1989. N 102. P. 473–480.

Lund E. D., Sidell B. D. Neutral lipid compositions of Antarctic fish tissues may reflect use of fatty acyl substrates by catabolic systems // Marine Biology. 1992. N 112. P. 377–382.

Murzina A. S., Nefedova Z. A., Falk-Petersen S., Hop H. (eds.). Lipids in The daubed shanny (Teleostei: *Leptoclinus maculatus*) in Svalbard waters // Polar biology. 2013a. N 36. P. 1619–1631.

Murzina A. S., Nefedova Z. A., Nemova N. N., Ripatti P. O., Pekkoeva S. N. Specific Fatty Acid status in the White sea Herring from Different Bays in the White sea in Regard to Ecological factors // BIONATURE. The Fourth International Conference on Bioenvironment, Biodiversity and Renewable Energies. 2013b. P. 9–12.

Petursdottir H., Gislason A., Falk-Petersen S. Lipid classes and fatty acid compositions of muscle, liver and skull oil in deep-sea redfish *Sebastes mentella* over the Reykjanes Ridge. Fish Biol. 2008. N 73. P. 2485–2496.

Robin J. H. Effect of diets containing η -linolenic acid on n-6 highly unsaturated fatty acid content of rotifer (*Brachionus plicatilis*) // Hydrobiologia. 1995. Vol. 26, N 3. P. 393–399.

Schuurmans Stekhoven F., Bonting S. L. Transport adenosine triphosphatases // Reviews in Physiol. 1981. N 61. P. 1–76.

Tocher D. R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in Teleost fish // Reviews in Fisheries Science. 2003. Vol. 12, N 2. P. 107–182.

Viron C., Saunio A., Andre P., Perly B., Laffose M. Isolation and identification of unsaturated fatty acid methyl esters from marine micro-algae // Analytica Chimica Acta. 2000. N 409. P. 257–266.

Viso A. C., Marty J. C. Fatty acids from 28 marine microalgae // Phytochemistry. 1993. Vol. 34, N 6. P. 1521–1533.

Wold A., Leu E., Walkusz W., Falk-Petersen S. Lipids in copepodite stages of *Calanus glacialis* // Polar biology. 2007. Vol. 30, N 5. P. 655–658.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Пеккоева Светлана Николаевна

стажер-исследователь
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: pek-svetlana@mail.ru
тел.: 89535266012

Мурзина Светлана Александровна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: murzina.svetlana@gmail.com
тел.: (8142) 571879

Pekkoeva, Svetlana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: pek-svetlana@mail.ru
tel.: 89535266012

Murzina, Svetlana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: murzina.svetlana@gmail.com
tel.: (8142) 571879

Нефедова Зинаида Анатольевна

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: znefed@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 571879

Руоколайнен Татьяна Рудольфовна

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: truok@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 571879

Рипатти Паули Онниевич

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ripatti@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Немова Нина Николаевна

директор, зав. лаб. экологической биохимии, главный
научный сотрудник, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 783615

Nefyodova, Zinaida

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: znefed@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 571879

Ruokolainen, Tatiana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: truok@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 571879

Ripatti, Pauli

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ripatti@bio.krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

Nemova, Nina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nemova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 783615

УДК: 597–154.31+591.5+574.24

РЕАКЦИИ МОЛОДИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ В УСЛОВИЯХ ПОСТОЯННОГО ПОВЫШЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ВОДЫ

В. К. Голованов, Д. С. Капшай

Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН

На примере молоди четырех видов рыб – обыкновенного карпа, плотвы, речного окуня и головешки-ротана – проанализированы поведенческие реакции в условиях постоянного нагрева со скоростью 9 °С/ч. Рыбы были акклиматизированы к двум уровням температуры – 18 ± 2 °С и 28 ± 1 °С. Впервые выявлены видовые отличия в характере горизонтальных (рывки) и вертикальных (всплытия к поверхности) перемещений молоди рыб в экспериментальных условиях при повышении температуры окружающей среды. Полученные данные могут характеризовать двигательную активность рыб при аномально высоких температурах.

К л ю ч е в ы е с л о в а: рыбы, поведение, двигательная активность, поведенческие реакции, температура акклиматизации, термоустойчивость, нагрев воды, критический термический максимум, летальная температура.

V. K. Golovanov, D. S. Kapshaj. THE RESPONSES OF THE JUVENILES OF SOME FISH SPECIES TO A CONTINUOUS WATER TEMPERATURE RISE

The behavioral responses to continuous heating at a 9 °C/h rate were analyzed in juveniles of four fish species – common carp, roach, perch and Amur sleeper. All the fish were acclimated to two levels of temperature – 18 ± 2 °C and 28 ± 1 °C. For the first time, the differences between species in the nature of horizontal (jerks) and vertical movements (ascent to the surface) of the fingerlings were identified under experimental conditions with a rising ambient temperature. These data can characterize the locomotory activity of fish at abnormally high temperatures.

K e y w o r d s: fish, behavior, locomotory activity, behavioral responses, acclimation temperature, heat tolerance, water heating, critical thermal maximum, lethal temperature.

Введение

В последнее время изучение верхней температурной границы жизнедеятельности рыб становится все более актуальным [Озернюк, 2000; Beitinger et al., 2000; Голованов, 2013а, б]. Это объясняется переменой ситуации в пресноводных водоемах Евразии и Северной Америки вследствие климатических изменений, аномально высоких значений температуры в летнее

время и увеличения количества тепловых сбросов в районах действующих и строящихся ГРЭС и АЭС. Для большого количества североамериканских и евроазиатских пресноводных видов получены количественные характеристики верхней летальной температуры рыб [Jobling, 1981; Алабастер, Ллойд, 1984; Beitinger et al., 2000; Голованов, 2013а, б]. Вместе с тем многие аспекты термоустойчивости рыб остаются малоизученными или неизвестными. В отношении

причин и механизмов гибели рыб в запредельно высокой температуре существуют разные мнения [Шмидт-Ниельсен, 1982]. При этом особенности поведения и двигательных реакций рыб в условиях постоянного нагрева от нормальной температуры обитания до аномально высокой сублетальной и летальной температуры практически не изучены.

Цель настоящей работы – определение особенностей поведения и двигательных реакций молоди некоторых видов рыб при акклимации к температуре 18 и 28 °С и постепенном нагреве воды со скоростью 9 °С/ч.

Материалы и методы

Работа выполнена в летне-осенние сезоны 2010–2013 гг. на молоди четырех видов пресноводных рыб – сазана или обыкновенного карпа *Cyprinus carpio* (L.), плотвы *Rutilus rutilus* (L.), речного окуня *Perca fluviatilis* L. и головешки-ротана *Perccottus glenii* Dybowski. Карп выращен на стационаре полевых и экспериментальных работ «Сунога» Института биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН. Плотва и речной окунь отловлены в прибрежье Рыбинского водохранилища 30-метровой мальковой волокушей. Головешка-ротан выловлен в прудах на побережье Рыбинского водохранилища. Длина тела и масса сеголетков карпа составляла $68,3 \pm 2,0$ мм, $10,6 \pm 0,8$ г, плотвы – $64,2 \pm 3,0$ мм, $4,0 \pm 0,6$ г, речного окуня – $42,2 \pm 0,8$ мм, $1,1 \pm 0,2$ г, головешки-ротана – $67,5 \pm 1,5$ мм, $3,5 \pm 0,2$ г. Всего исследовано 192 экз. рыб (по 48 экз. каждого вида). Температура предварительной акклимации всех рыб составляла 18 ± 2 °С и 28 ± 1 °С, продолжительность периода акклимации – 10 суток при естественном фотопериоде. В течение акклимации всех рыб кормили 1–2 раза в сутки живым зоопланктоном и личинками хирономид в объеме 5–10 % от общей массы тела.

Затем группу рыб (по 6 экз. в каждой, две повторности) помещали в экспериментальный аквариум объемом 60 л, оборудованный системой нагрева и аэрации. Температуру воды в опытном аквариуме повышали со средней скоростью около 9 °С/ч до нарушения локомоторной функции рыб – переворота на бок или кверху брюшком, сублетальное значение температуры фиксировали как критический термический максимум – КТМ [Becker, Genoway, 1979]. Продолжая нагрев до момента прекращения движения жаберных крышек, фиксировали значение летальной температуры (ЛТ) по этому показателю. Все опыты проводили в условиях естественного фотопериода. Более

подробно метод определения верхней летальной температуры (ВЛТ) и схема экспериментальной установки описаны ранее [Голованов и др., 2012].

Методика анализа поведенческих реакций молоди рыб при нагреве оригинальна и разработана впервые. Она заключалась в регистрации горизонтальных и вертикальных передвижений рыб – рывков и всплываний к поверхности в условиях 60-литрового экспериментального аквариума (по 6 экз. каждого вида, две повторности). Перед началом опыта особи, помещенные в экспериментальную установку, в течение определенного промежутка времени ~1 ч. находились при постоянном значении температуры воды, которое соответствовало температуре предварительной акклимации. Это давало возможность рыбам адаптироваться к новым условиям и нивелировать влияние стресса на поведенческие и физиологические реакции. В каждом опыте при каждом уровне акклимации использовано по шесть особей. С начала нагрева производили регистрацию двигательной активности рыб: 1 – рывков (или горизонтальных перемещений); 2 – всплываний к поверхности (или вертикальных перемещений). Рывок расценивался как перемещение особи на 2–3 длины тела в горизонтальном или горизонтально-диагональном направлении. Всплывание к поверхности (в вертикальном направлении) идентифицировалось как перемещение особи к поверхности воды и обратно. Время, в течение которого проводили наблюдение за двигательной активностью рыб, составляло при акклимации к температуре 18 °С ~2 ч, при акклимации к 28 °С – ~1 ч.

Также производили регистрацию качественных реакций, служивших для описания поведения рыб, – затаивание, пребывание в течение продолжительного времени в определенной части аквариума или «отстаивание», движение кругом, мышечные спазмы, передвижение назад (т. е. вперед хвостом), вставание на рыло и другие реакции, которые позволяли более полно охарактеризовать общую картину поведения молоди рыб.

При анализе двигательных реакций рыб при нагреве весь температурный диапазон от начала нагрева и до гибели особи разделяли на интервалы величиной в 3–6 °С. Они составляли 16–19, 20–22, 23–25, 26–28, 29–35 и 34–38 °С при акклимации рыб к более низкой температуре и 27–29, 30–33 и 34–38 °С при акклимации рыб к более высокой температуре. Величина интервала в начале опыта и при температуре выше оптимального значения (судя по окончательно избираемой температуре – ОИТ) была

несколько больше. В конце опыта осуществляли подсчет элементов двигательных реакций у всех шести рыб в данном диапазоне и рассчитывали среднее количество бросков и всплываний, приходящееся на одну особь. Анализ двигательной активности в разные интервалы температуры при постоянном нагреве позволял более детально оценивать интенсивность изменения поведенческих реакций молоди рыб, а также уточнять, при каком уровне термального воздействия начинают проявляться те или иные различия в перемещении рыб по аквариуму [Капшай, Голованов, 2011].

Данные обработаны статистически с помощью пакета прикладных программ Statgraphics Plus 5.1 и Excel 2003. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). При парном сравнении результатов достоверность различий между ними оценивали по критерию Стьюдента (t) при уровне значимости $p < 0,05$ [Sokal et al., 1995].

Результаты и обсуждение

Экспериментальные данные по определению значений КТМ и ЛТ у молоди четырех видов рыб представлены в таблице. Наибольшее значение КТМ ($35,6^{\circ}\text{C}$) при температуре акклимации 20°C , как и ожидалось, показали особи карпа. Несколько ниже уровень КТМ у другого теплолюбивого вида – головешки-ротана ($34,8^{\circ}\text{C}$). У плотвы и окуня значения КТМ оказались равными и составили 32°C . При акклимации к более высокой температуре (28°C) наибольший уровень КТМ отмечен у сеголетков карпа ($39,7^{\circ}\text{C}$), несколько ниже – у головешки-ротана ($37,6^{\circ}\text{C}$), значения КТМ у плотвы и окуня были близки и составили $36,5$ и $35,8^{\circ}\text{C}$ соответственно. У исследованных видов рыб при повышении температуры акклимации с 20 до 28°C значения КТМ увеличиваются: на $4,1$; $2,8$; $4,5$ и $3,8^{\circ}\text{C}$ у карпа, плотвы, окуня и головешки-ротана соответственно. Приведенные в таблице экспериментальные данные, за исключением впервые полученных значений по КТМ и ЛТ у плотвы и окуня, у рыб, акклимированных к температуре 28°C , более подробно обсуждались ранее [Голованов и др., 2012; Капшай, Голованов, 2013]. Эти данные позволили выстроить сравнительный ряд значений КТМ и ЛТ у четырех видов исследованных рыб при акклимации к низкой (18°C) и высокой (28°C) температуре и определить верхнюю температурную границу жизнедеятельности молоди данных видов, до которой происходил постоянный нагрев. Отметим, что значения ЛТ выше КТМ на $0,3$ – $1,6^{\circ}\text{C}$ у рыб, акклимированных к более низкой, и вы-

ше на $0,4$ – $1,0^{\circ}\text{C}$ у сеголетков, акклимированных к более высокой температуре. То есть диапазон температуры после потери молодью рыб локомоторной способности (переворот на бок или кверху брюшком) до прекращения движения жаберных крышек невелик. Выявленные значения КТМ хорошо согласуются с тем, что карп и головешка-ротан по характеристике ОИТ и ВЛТ относятся к наиболее теплолюбивым видам рыб, а плотва и окунь – просто к теплолюбивым [Голованов, 2013а, б]. Интересно отметить и тот факт, что акклимация 12 экз. сеголетков щуки *Esox lucius* L. к температуре 28°C (две повторности) оказалась безуспешной, все особи погибали в течение 3–7 суток акклимации. Очевидно, это связано с тем, что термоустойчивость у щуки несколько меньше, чем у плотвы или речного окуня.

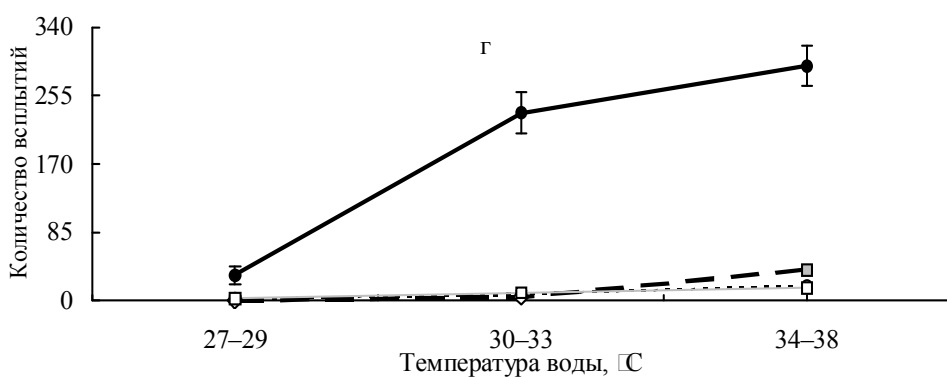
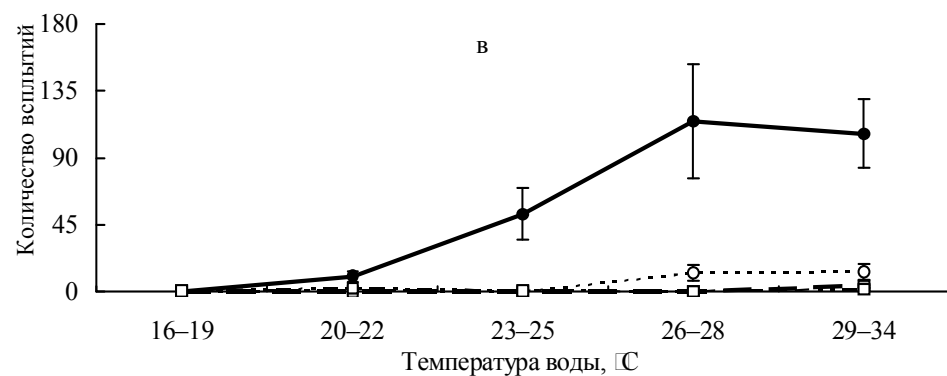
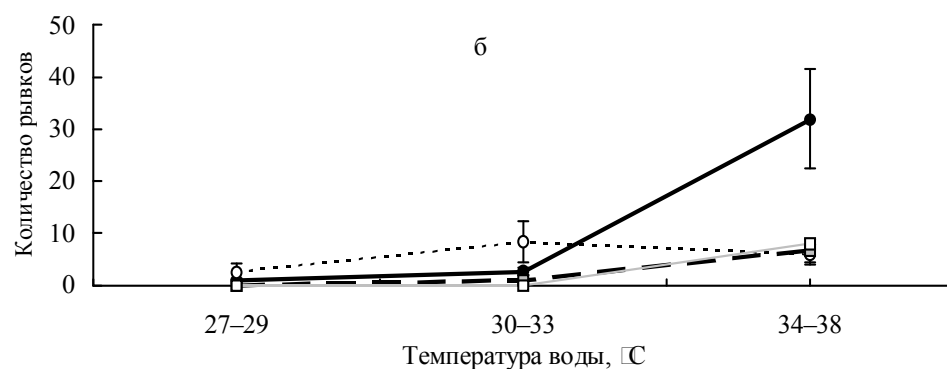
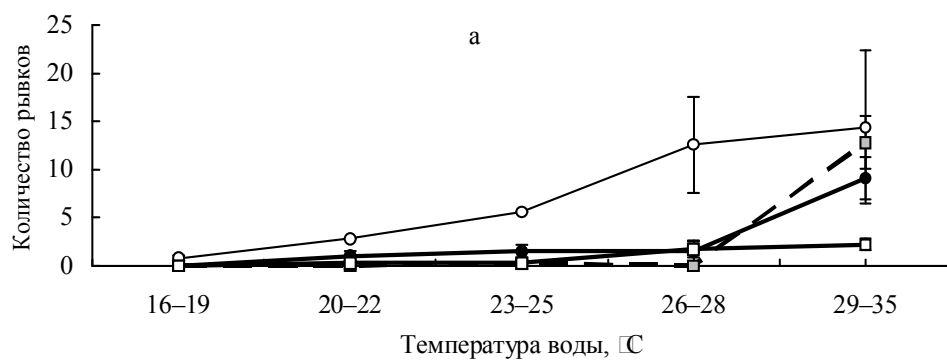
Верхние летальные температуры молоди рыб при постоянном нагреве воды

Вид	ТА, 20°C		ТА, 28°C	
	КТМ	ЛТ	КТМ	ЛТ
Карп	$35,6 \pm 0,1^*$	$36,5 \pm 0,2^*$	$39,7 \pm 0,1$	$40,5 \pm 0,1$
Головешка-ротан	$34,8 \pm 0,2$	$36,4 \pm 0,1^*$	$37,6 \pm 0,2$	$38,2 \pm 0,2$
Плотва	$32,0 \pm 0,3$	$32,6 \pm 0,3$	$36,5 \pm 0,1^*$	$37,5 \pm 0,1^*$
Окунь	$32,0 \pm 0,3$	$33,3 \pm 0,2^*$	$35,8 \pm 0,1$	$36,2 \pm 0,1$

Примечание. ТА – температура акклимации, * – различия значений ЛТ и КТМ при соответствующем уровне акклимации статистически достоверны, $p < 0,05$.

Результаты регистрации двигательных реакций у молоди различных видов рыб при нагреве воды представлены на рисунке. Поведение рыб в начальных диапазонах нагрева (16 – 20 , 20 – 22 и 27 – 29°C при акклимации к температуре 18 и 28°C соответственно) практически не отличалось от поведения рыб в обычных условиях. Исследовательское поведение особей было на низком уровне, элементов территориального или социального поведения не отмечено. Молодь исследуемых видов находилась у дна или сосредотачивалась в углах аквариума. Такое поведение отражает индифферентность сеголетков всех исследованных видов рыб к повышению температуры воды на 2 – 6°C относительно начального уровня, независимо от уровня температуры предварительной акклимации. Такие колебания температуры воды в естественных условиях вполне обычны и спокойно переносятся молодью рыб [Алабастер, Ллойд, 1984].

Дальнейшее увеличение температуры воды (в интервале 23 – 25 и 30 – 33°C соответственно при акклимации к температуре воды 18 и 28°C) приводит к переходу от пассивного состояния к стадии слабой двигательной активности. Рыбы начинают исследовать про-



Двигательные реакции карпа *Cyprinus carpio* (—●—), плотвы *Rutilus rutilus* (—○—), речного окуня *Perca fluviatilis* (—■—) и головешки-ротана *Percottus glenii* (—□—) при нагреве воды. Количество бросков при температуре акклимации 18 °C (а) и 28 °C (б); количество всплытий к поверхности при температуре акклимации 18 °C (в) и 28 °C (г)

странство аквариума, несколько увеличивается скорость передвижения, число всплытий к поверхности (по вертикали) и бросков (по горизонтали) у некоторых видов. Особи

плотвы характеризовались проявлением активности только у дна, с некоторым увеличением числа бросков (при акклимации к температуре и 18 и 28 °C). Количество бросков

при более низкой температуре акклимации у карпа было минимальным, но существенно увеличивалось число всплытий к поверхности при обеих температурах акклимации. Двигательные реакции молоди окуня и головешки-ротана были минимальными.

В случае акклимации к низкой температуре при нагреве в интервале 26–28 °С количество рывков у трех видов – карпа, окуня и головешки-ротана остается незначительным, у плотвы оно резко возрастает. В то же время количество вертикальных перемещений (всплытий), напротив, резко возрастало у карпа, но было минимальным у остальных трех видов, включая плотву. Последующее увеличение температуры воды от близкой к оптимальному значению вплоть до летального уровня (29–35 °С) полностью изменяло характер двигательной активности рыб. Количество рывков сильно возрастало у карпа и окуня, почти достигая уровня реакции у плотвы. И только у головешки-ротана рывки практически не отмечались. Число всплытий к поверхности воды у молоди карпа оставалось высоким, остальные три вида этой реакции практически не проявляли. По мере приближения к уровню КТМ наблюдались такие реакции, как движение кругом, мышечные спазмы, передвижение назад (т. е. вперед хвостом), вставание на рыло, дефекация.

В случае акклимации к высокой температуре при нагреве в интервале 34–38 °С уже не плотва, а карп существенно увеличивал число и бросков, и всплытий к поверхности, реагируя на неблагоприятные условия. У остальных трех видов число бросков и всплытий было незначительным. И только непосредственно перед достижением уровня КТМ у них наблюдались такие реакции, как движение кругом, мышечные спазмы, передвижение назад, вставание на рыло, дефекация и др.

Таким образом, у сеголетков окуня двигательные реакции проявлялись только в интервале сублетальных и летальных значений температуры, то есть повышение температуры воды даже на 10–12 °С практически не сказывалось на поведении данного вида. Молодь головешки-ротана индифферентна к нагреву в широком диапазоне температуры вплоть до сублетальных ее значений. То есть и молодь окуня, и молодь головешки-ротана можно признать более устойчивыми к повышению температуры среды. В то же время характер двигательной активности плотвы и карпа существенно отличается от реакций окуня и головешки-ротана. Начиная с температуры 23–25 °С (при акклимации к темпера-

туре 18 °С) эти два вида демонстрируют увеличение числа двигательных реакций. У карпа это проявляется в увеличении числа всплытий, а у плотвы – бросков. При акклимации к температуре воды 28 °С повышенную двигательную активность (всплытия) проявляет только один вид – карп. При этом активность примерно в два раза превышает таковую в сравнении с акклимацией к более низкой температуре.

Заключительные этапы нагрева (перед реакцией переворота тела) у трех видов характеризовались повышением двигательной активности: у карпа – вертикальными и горизонтальными перемещениями, у плотвы и окуня – горизонтальными перемещениями. В целом по уровню интенсивности поведенческих реакций рыб при нагреве воды наиболее резко выделялись особи карпа, меньшим числом реакций характеризовалась молодь плотвы. У сеголетков окуня и головешки-ротана отмечалась достаточно инертная стратегия двигательного поведения.

Следует отметить, что при акклимации к температуре 18 °С и длительном постепенном нагреве рыбы по-разному реагируют на прохождение зоны ОИТ. Как известно, ОИТ карпа, плотвы, окуня и головешки-ротана составляют 30,0; 26,0; 25,7 и 27,5–28,5 °С соответственно [Голованов, 2013а, б]. И окунь, и головешка-ротан индифферентны к нагреву, плотва при 26–28 °С увеличивает число бросков, а карп увеличивает число всплытий, однако такая тенденция отмечается и при несколько более низкой температуре – 23–25 °С. Характерно, что если нагрев начинается непосредственно от температуры, близкой к значению эколого-физиологического оптимума, минимальная двигательная активность у пяти видов рыб – карпа, атлантического лосося *Salmo salar* L., серебряного карася *Carassius auratus* L., синезаберного солнечника *Lepomis macrochirus* Rafinesque и желтого окуня *Perca flavescens* (Mitchill) – отмечается именно в зоне ОИТ, после чего существенно возрастает по мере приближения к верхней температурной границе жизнедеятельности [Ивлев, 1960; Reynolds, Casterlin, 1978, 1979]. Как показывают наши эксперименты в условиях акклимации к температуре 28 °С, близкой к зоне ОИТ, у четырех исследованных видов все не так однозначно. Если для двух видов, плотвы и карпа, интенсивность двигательных реакций возрастает, то для окуня (в меньшей степени) и для головешки-ротана (в большей степени) это повышение температуры не имеет существенного значения.

Примерная схема поведения молоди исследованных видов при нагреве с постоянной скоростью такова. Вначале отмечается почти полное отсутствие двигательных реакций, затем некоторое их увеличение. Наконец, по достижении некоторого уровня температуры двигательная активность рыб (количество рывков и всплытий к поверхности) существенно возрастает до температуры, при которой происходит потеря локомоторной способности и летальный исход. Существуют видовые особенности реакций на конкретных этапах нагрева с постоянной скоростью.

Очевидно, что форма тела, а также расположение и форма плавников у молоди исследованных видов несколько различаются. Веретенообразное тело у карпа, продолговатое у плотвы и форма тела окуня и головешки-ротана неодинаковы. Насколько эти особенности влияют на возможные реакции и двигательную активность исследованных видов, еще предстоит выяснить. В то же время показано, что у серебряного карася форма тела и плавников, в сравнении с другими видами, не влияет на способность рыб преодолевать препятствия в горизонтальном или вертикальном направлениях [Webb et al., 1996].

Для оценки двигательных реакций молоди рыб в условиях нагрева необходимы дальнейшие эксперименты. Однако ясно, что у разных видов рыб характер двигательной активности в условиях постоянного нагрева в широком диапазоне температуры вплоть до сублетальных (КТМ) и летальных значений (ЛТ) существенно различается. Такая информация может быть использована в качестве дополнительной характеристики поведения рыб при разработке критериев тепловой нагрузки на пресноводные водоемы в районах сброса подогретых вод тепловых и атомных станций. Поскольку известно, что значение температуры выше 30 °С для многих теплолюбивых видов рыб становится потенциально опасным [Мордухай-Болтовской, 1975; Голованов, 2013а, б], а усиление двигательной активности молоди исследованных видов приходится именно на интервалы температуры выше 29–30 °С, полученные материалы представляют не только теоретический интерес, но и практическую значимость. К сожалению, особенности поведения и двигательная активность рыб в условиях нагрева в разных диапазонах температуры жизнедеятельности пресноводных рыб малоизученны, что требует постановки новых оригинальных исследований.

Заключение

Впервые для молоди четырех видов пресноводных рыб – карпа, плотвы, окуня и головешки-ротана – получены новые экспериментальные данные, характеризующие их двигательную активность в горизонтальном и вертикальном направлении в зависимости от низкой (18 °С) или высокой (28 °С) температуры акклимации. Наибольшей активностью при нагреве отличаются сеголетки карпа, существенно ниже активность у плотвы, минимальная активность при сублетальной температуре зарегистрирована у окуня. Реакции карпа и плотвы отличаются в зависимости от температуры акклимации, интервала температуры во время нагрева, а также по типу реакции (рывки у плотвы, сочетание рывков и всплытий у карпа). Молодь головешки-ротана индифферентна по отношению к постепенному повышению температуры среды вплоть до потери локомоторной способности. Таким образом, обнаружены видовые отличия в поведении (двигательной активности) молоди рыб в условиях постоянного нагрева. Полученные данные имеют не только теоретический интерес, но могут быть использованы также в качестве дополнительной информации при разработке критериев тепловой нагрузки на пресноводные водоемы.

Исследование выполнено при поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» и Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-2666.2014.4 «Экологические аспекты адаптаций и популяционная организация у рыб».

Литература

- Алабастер Дж., Ллойд Р. Критерии качества воды для пресноводных рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 384 с.
- Голованов В. К. Эколого-физиологические закономерности распределения и поведения пресноводных рыб в термоградиентных условиях // Вопросы ихтиологии. 2013а. Т. 53, № 3. С. 286–314.
- Голованов В. К. Температурные критерии жизнедеятельности пресноводных рыб. Москва: Полиграф-Плюс, 2013б. 300 с.
- Голованов В. К., Смирнов А. К., Капшай Д. С. Сравнительный анализ окончательно избираемой и верхней летальной температуры у молоди некоторых видов пресноводных рыб // Труды КарНЦ РАН. Сер. Эксперим. биология. 2012. № 2. С. 70–75.
- Ивлев В. С. Анализ механизма распределения рыб в условиях температурного градиента // Зоол. журнал. 1960. Т. 39, вып. 4. С. 494–499.

Капшай Д. С., Голованов В. К. Оценка верхних летальных температур и поведения молоди рыб в сублетальной зоне жизнедеятельности // Современные проблемы биологии, экологии, химии: материалы Международной научно-практической конференции, г. Ярославль, 24–25 ноября 2011 г. Ярославль: ЯрГУ, 2011. С. 56–63.

Капшай Д. С., Голованов В. К. Верхняя летальная температура у молоди теплолюбивых видов рыб в зависимости от температуры акклимации // Труды КарНЦ РАН. Сер. Эксперим. биология. 2013. № 3. С. 185–189.

Мордухай-Болтовской Ф. Д. Проблема влияния тепловых и атомных электростанций на гидробиологический режим водоемов (обзор) // Экология организмов водохранилищ-охладителей. Л.: Наука, 1975. С. 7–69.

Озернюк Н. Д. Температурные адаптации. М.: Изд-во Московского ун-та, 2000. 205 с.

Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. При- способность и среда. Кн. 1. М.: Мир, 1982. 416 с.

Becker C. D., Genoway R. G. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish // Environ. Biol. Fish. 1979. Vol. 4, N 3. P. 245–256.

Beitinger T. L., Bennet W. A., McCauley R. W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature // Environ. Biol. Fish. 2000. Vol. 58, N 3. P. 237–275.

Jobling M. Temperature tolerance and the final preferendum – rapid methods for the assessment of optimum growth temperature // J. Fish. Biol. 1981. Vol. 19, N 4. P. 439–455.

Reynolds W. W., Casterlin M. E. Effect of temperature on locomotor activity in the goldfish (*Carassius auratus*) and the bluegill (*Lepomis macrochirus*): presence of an «activity well» in the region of the final preferendum // Hydrobiologia. 1978. Vol. 65, N 1. P. 3–5.

Reynolds W. W., Casterlin M. E. Behavioral thermoregulation and locomotor activity of *Perca flavescens* // Can. J. Zool. 1979. Vol. 57, N 11. P. 2239–2242.

Sokal R. R., Rolf F. J. Biometry. The principals and practice of statistics in biological research. New York: W. H. Freeman and Co., 1995. 887 p.

Webb P. W., Laliberte G. D., Schrank A. J. Does body and fin form affect the maneuverability of fish traversing vertical and horizontal slits? // Environ. Biol. Fish. 1996. Vol. 46, N. 1. P. 7–14.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Голованов Владимир Константинович

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
а/я 9, Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл.,
Россия, 152742
эл. почта: vkgolovan@mail.ru
тел.: (48547) 24484

Капшай Дмитрий Сергеевич

аспирант
Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН
п. Новый Некоуз, Некоузский р-н, Ярославская обл.,
Россия, 152730
эл. почта: kapshbio@rambler.ru
тел.: (48547) 21264

Golovanov, Vladimir

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters,
Russian Academy of Sciences
p/o box 9, 152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia
e-mail: vkgolovan@mail.ru
tel.: (48547) 24484

Kapshaj, Dmitriy

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters,
Russian Academy of Sciences
152730 New Nekouz, Yaroslavl Region, Russia
e-mail: kapshbio@rambler.ru
tel.: (48547) 24484

УДК 581.1

УЛЬТРАСТРУКТУРА ХЛОРОПЛАСТОВ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ И ДЕЙСТВИИ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ

Ю. В. Венжик¹, В. В. Таланова¹, А. Ф. Титов¹, Е. А. Мирославов²

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН

На проростках пшеницы показано, что экзогенная абсцизовая кислота (АБК) не только вызывает дополнительный прирост устойчивости клеток листьев в процессе холодовой адаптации (4 °C), но и модифицирует ультраструктуру хлоропластов. В частности, при закаливании пшеницы в присутствии экзогенной АБК (0,1 мМ) зафиксированы дополнительное увеличение площади хлоропластов, уплотнение стромы, образование выростов хлоропластов, а также изменения в тилакоидной системе пластид. Очевидно, что обнаруженные ультраструктурные изменения хлоропластов участвуют в формировании повышенной устойчивости клеток листьев, поддерживая и «фиксируя» определенную часть происходящих при этом функциональных изменений и обеспечивая тем самым более долгосрочную основу для адаптации растений к продолжительному действию низких температур.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Triticum aestivum* L., холодовое закаливание, абсцизовая кислота, холодоустойчивость, ультраструктура хлоропластов.

Yu. V. Venzhik, V. V. Talanova, A. F. Titov, E. A. Miroslavov. THE ULTRASTRUCTURE OF CHLOROPLASTS IN WHEAT DURING COLD ADAPTATION AND ABA INFLUENCE

The study of wheat seedlings showed that exogenous abscisic acid (ABA) not only stimulated an additional increase of the leaf cells cold tolerance in the process of cold adaptation (4 °C) but also modified the ultrastructure of chloroplasts. In particular, the results gained during wheat hardening with exogenous ABA (0.1 mM) indicated an additional increase in the area and density of the chloroplasts stroma, formation of numerous invaginations in chloroplasts as well as changes in the plastids thylakoid system. It seems that most of the observed ultrastructural changes in chloroplasts are involved in the formation of an increased leaf cells tolerance and meant to “fix” and support a certain part of functional changes, promoting thereby the long-term cold tolerance of the plants.

Key words: *Triticum aestivum* L., cold hardening, abscisic acid, cold tolerance, ultrastructure of chloroplasts.

Введение

Абсцизовая кислота (АБК), которую часто называют гормоном стресса, играет очень важную

роль в механизмах адаптации растений к различным неблагоприятным факторам внешней природы, включая низкие температуры [Титов, Таланова, 2009; Catalá, Salinas, 2010]. Установ-

лено, в частности, что формирование высокой устойчивости растений в процессе низкотемпературного закаливания сопровождается быстрым накоплением этого гормона [Титов, Таланова, 2009; Catalá, Salinas, 2010], а экзогенная АБК способна вызывать дополнительный, и очень заметный, прирост холодоустойчивости растений в этих условиях [Bakht et al., 2006; Титов, Таланова, 2009]. Механизмы, лежащие в основе данного явления, активно исследуются [Bakht et al., 2006; Титов, Таланова, 2009; Catalá, Salinas, 2010], но до сих пор не до конца раскрыты. Например, слабо изучено влияние АБК на фотосинтетический аппарат (ФСА) растений в условиях действия низкой температуры, хотя именно хлоропласты одними из первых реагируют на охлаждение [Kratsch, Wise, 2000; Crosatti et al., 2013]. Известно, что при холодной адаптации в листьях растений формируются хлоропласты так называемого «светового типа» – крупные пластиды с мелкими гранами [Kratsch, Wise, 2000; Венжик и др., 2012]. Такая структура хлоропластов имеет очевидное адаптивное значение для растений в условиях низкой температуры [Венжик и др., 2012], поскольку именно в мембранах гран локализуется фотосистема II, наиболее чувствительная к действию холода [Crosatti et al., 2013]. Логично ожидать, что предобработка растений экзогенной АБК, вызывающей дополнительный прирост холодоустойчивости при закаливании растений, может способствовать и ультраструктурной реорганизации хлоропластов. Подобное предположение подтверждается имеющимися в литературе сведениями о стабилизирующем влиянии АБК на функциональную активность ФСА при холодовом закаливании. Показано, например, что обработка АБК приводит к увеличению коэффициента нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла и максимального квантового выхода фотосистемы II у закаленных проростков люцерны [Zhou et al., 2006], а также стабилизирует уровень хлорофиллов и каротиноидов в листьях проростков риса, подвергнутых охлаждению [Flores-Nemedes et al., 1993]. Помимо этого установлено, что АБК влияет на экспрессию ряда генов, кодирующих белки и ферменты ФСА, в том числе рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазу/оксигеназу и протеины светособирающего пигментного комплекса [Медведев, Шарова, 2011; Yamburenko et al., 2013]. Однако в известной нам литературе отсутствуют данные, позволяющие судить о возможных ультраструктурных изменениях, происходящих в хлоропластах под влиянием АБК при низкотемпературном закаливании. В связи с этим нами изучено влияние экзогенной АБК на

холодоустойчивость клеток листа и ультраструктуру хлоропластов в процессе холодной адаптации пшеницы.

Материалы и методы

Исследование выполнено с использованием приборно-аналитической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН. Опыты проводили на недельных проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, выращенных на питательном растворе с добавлением микроэлементов (рН 6,2–6,4) в камере искусственного климата при температуре воздуха 22 °С, его относительной влажности 60–70 %, освещенности около 10 клк и 14-часовом фотопериоде. По достижении недельного возраста проростки подвергали воздействию низкой закалывающей температуры (4 °С) в течение 4 сут, сохраняя прочие условия эксперимента неизменными. Часть проростков за сутки до закаливания помещали на растворы АБК (0,1 мМ) (ICN, США).

О холодоустойчивости листьев судили по температуре (LT_{50}), вызывающей гибель 50 % палисадных клеток листовых высечек после их 5-мин. промораживания в термоэлектрическом микрохолодильнике ТЖР-02/–20 («Интерм», Россия) [Балагурова и др., 1982]. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью светового микроскопа ЛОМО Микмед-2 («ЛОМО», Россия) по коагуляции цитоплазмы и деструкции хлоропластов. Каждый опыт повторяли не менее трех раз с 6-кратной биологической повторностью.

Для электронно-микроскопического исследования брали высечки из средней трети пластинки 3–5 листьев и фиксировали их при температуре 0–4 °С 3%-м глютаровым альдегидом на фосфатном буфере (рН 7,2), а затем 2%-м раствором OsO_4 . Обезвоженный в серии спиртов и ацетонов материал окрашивали уранил-ацетатом и заливали в смесь эпоксидных смол. Срезы палисадной паренхимы листьев получали на ультрамикротоме Ultracut («Reichert», Австрия), контрастировали цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе Hitachi 600 («Hitachi», Япония) при увеличении 1000–25000. Морфометрический анализ ультраструктуры проводился на клетках 1-го субэпидермального слоя мезофилла по стандартным методикам [Венжик и др., 2012] на 25–50 хлоропластах в каждом варианте опыта. Коэффициент гранальности рассчитывали как отношение длины мембран тилакоидов в гранах к длине мембран, контактирующих со стромой.

В таблицах и на графиках приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. О достоверности отличий судили с помощью критерия Стьюдента. В статье обсуждаются только величины, достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что под влиянием температуры 4 °С холодоустойчивость клеток листьев пшеницы возрастает уже в течение первых суток закаливания, достигая максимального в данных условиях уровня на 4-е сут (рис. 1). Экзогенная АБК вызывала дополнительный прирост устойчивости, которая уже через 24 ч от начала опыта заметно превышала максимальный уровень, достигнутый при закаливании без гормона в течение 4 сут. Затем до конца опыта устойчивость проростков, обработанных АБК, сохранялась неизменной (см. рис. 1).

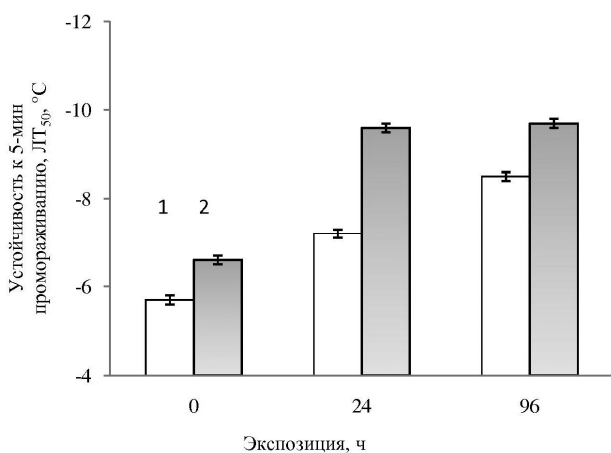


Рис. 1. Влияние АБК и температуры 4 °С на холодоустойчивость клеток листа у проростков пшеницы: 1 – 4 °С; 2 – 4 °С + АБК (0,1 мМ)

Ультраструктура хлоропластов у проростков пшеницы, выращенных при 22 °С, была типичной для этого вида растений: хлоропласты правильной линзовидной формы содержали мелкозернистую строму, в которой располагались многочисленные граны и хорошо развитая система межгранных тилакоидов (рис. 2, а). При закаливании (4 °С) проростков без АБК визуально отмечено уменьшение размеров гран (рис. 2, б), а также укрупнение самих хлоропластов и появление в них многочисленных инвагинаций (рис. 2, в). При совместном влиянии АБК и закалывающей температуры структура хлоропластов претерпевала дополнительные изменения: уже в течение первых 24 ч опыта наблюдалось заметное уплотнение стромы, а в хлоропластах отмечено появление выростов (рис. 2, г), которые называют стромулами [Gray et al., 2012]. В дальнейшем (спустя 4 сут) визуально зафиксировано «разбухание» хлоропластов (рис. 2, д), а около пластид появлялись скопления митохондрий и пероксисом (см. рис. 2, д, е).

Морфометрический анализ ультраструктуры хлоропластов позволил подтвердить, что под влиянием низкой температуры в клетках мезофилла пшеницы формируются хлоропласты «светового типа» – крупные, с мелкими гранями и низким коэффициентом гранальности, что свидетельствует о преобладании тилакоидов стромы над тилакоидами гран (табл.). У закаленных проростков, обработанных АБК, зафиксировано еще большее увеличение размеров пластид за счет площади их стромы (спустя 4 сут от начала опыта), а также увеличение количества гран и коэффициента гранальности (см. табл.).

Таким образом, предобработка растений пшеницы АБК не только индуцирует дополнительный прирост их устойчивости в процессе

Влияние АБК и температуры 4 °С на ультраструктуру хлоропластов у проростков пшеницы

Экспозиция, ч	Площадь среза хлоропласта, мкм ²	Площадь среза стромы, мкм ²	Число гран на 10 мкм ² среза хлоропласта (шт)	Число тилакоидов в гране (шт)	Коэффициент гранальности
22 °С					
0	7,9 ± 0,7	3,8 ± 0,2	37 ± 2	7 ± 0,2	1,3
24	9,2 ± 0,4	4,2 ± 0,1	34 ± 3	8 ± 0,3	1,2
96	11,0 ± 0,3	5,0 ± 0,3	35 ± 3	8 ± 0,4	1,2
4 °С					
0	7,9 ± 0,7	3,8 ± 0,2	37 ± 2	7 ± 0,2	1,3
24	13,9 ± 0,7a	7,5 ± 0,3a	28 ± 2a	6 ± 0,3a	1,0
96	12,4 ± 0,3a	7,3 ± 0,3a	26 ± 2a	6 ± 0,3a	1,0
4 °С + АБК					
0	7,9 ± 0,7	3,8 ± 0,2	37 ± 2	7 ± 0,2	1,3
24	13,8 ± 0,5	8,9 ± 0,3b	27 ± 4	8 ± 0,4b	1,4
96	15,9 ± 0,5b	9,2 ± 0,4b	45 ± 2b	6 ± 0,3	2,1

Примечание. а – отличия от проростков контрольного варианта (22 °С), достоверны при $p \leq 0,05$; b – отличия от проростков, закалываемых без АБК (4 °С), достоверны при $p \leq 0,05$.

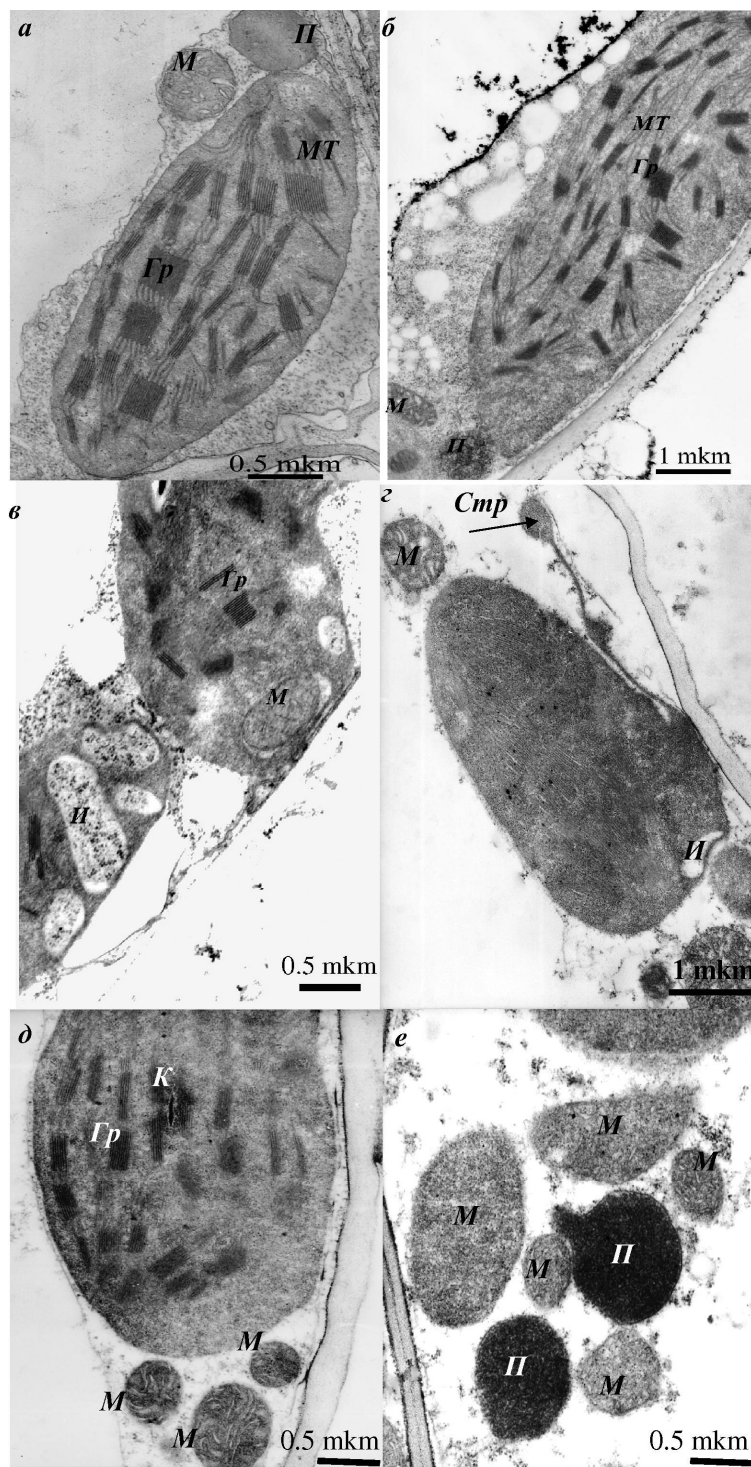


Рис. 2. Влияние АБК на ультраструктуру хлоропластов в клетках мезофилла закаленных (4 °С) проростков пшеницы: а – исходный вариант (22 °С); б, в – закаливание при 4 °С в течение 24 ч (б) и 96 ч (в); г, д, е – совместное влияние 4 °С + АБК (0,1 мМ) в течение 24 ч (г) и 96 ч (д, е); Гр – граны, МТ – межгранные тилакоиды, К – крахмальное зерно, Стр – стромулы (выросты хлоропласта), И – инвагинации, М – митохондрия, П – пероксисома

холодовой адаптации, но и заметно модифицирует ультраструктуру хлоропластов, сформированную в клетках листьев под влиянием низкой температуры. С одной стороны, экзогенная

АБК вызывает дополнительное увеличение размеров хлоропластов, а с другой – нарушает процесс формирования пластид по «световому типу», обуславливая рост коэффициента гра-

нальности. Существенное укрупнение пластид, вызванное гормоном, очевидно связано с оттоком воды из цитоплазмы в хлоропласты и накоплением в их стромах осмолитиков (дегидринов, пролина, сахарозы и др.), синтез которых усиливается под влиянием АБК [Медведев, Шарова, 2011]. С этим же может быть связано уплотнение стромы пластид, визуально выявляемое уже через 24 ч от начала опыта. Дополнительному увеличению поверхности хлоропластов способствуют выросты пластид (стромулы), образование которых усиливается под влиянием гормона [Gray et al., 2012]. Согласно имеющимся в литературе предположениям, стромулы, выполняя транспортную функцию, могут обеспечивать более интенсивный обмен метаболитами между хлоропластами, другими органеллами клетки и цитоплазмой [Gray et al., 2012]. Об усилении метаболизма свидетельствуют и многочисленные скопления митохондрий и пероксисом около пластид. Что касается влияния АБК на тилакоидную систему хлоропластов, подчеркнем, что увеличение коэффициента гранальности в ее присутствии происходит за счет формирования большего количества гран, но среднее число тилакоидов в гране при этом остается небольшим. В литературе имеются сведения о стабилизирующем действии АБК на мембраны, в том числе фотосинтетические [Chen, Li, 2002; Saibo et al., 2009; Theocharis et al., 2012]. Прежде всего стабилизация мембран под влиянием АБК происходит за счет усиления активности антиоксидантов, препятствующих перекисному окислению липидов [Chen, Li, 2002; Saibo et al., 2009; Theocharis et al., 2012]. Кроме того, АБК регулирует степень десатурации жирных кислот и текучесть мембран [Bakht et al., 2006; Catalá, Salinas, 2010], что немаловажно в условиях охлаждения. Мы можем также предполагать, что АБК способна влиять на процессы гранообразования, усиливая экспрессию генов, регулирующих синтез мембранных белков в условиях низкотемпературного закаливания.

Таким образом, в данной работе на примере озимой пшеницы впервые показано, что экзогенная АБК в условиях холодного закаливания вызывает ряд существенных изменений в ультраструктурной организации хлоропластов. Следовательно, можно утверждать, что прирост устойчивости, индуцируемый АБК, связан не только с различными функциональными (метаболическими) изменениями, но и с определенными структурными преобразованиями, в частности, с ультраструктурной реорганизацией ФСА.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, соглашение № 8050.

Литература

- Балагурова Н. И., Дроздов С. Н., Хилков Н. И. Метод определения устойчивости растительных тканей к промораживанию. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1982. 6 с.
- Венжик Ю. В., Титов А. Ф., Таланова В. В., Мировославов Е. А., Котеева Н. К. Структурно-функциональная реорганизация фотосинтетического аппарата растений пшеницы при холодной адаптации // Цитология. 2012. Т. 54, № 12. С. 916–924.
- Медведев С. С., Шарова Е. И. Биология развития растений. В 2-х т. Начала биологии развития растений. Фитогормоны. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2011. Том 1. 252 с.
- Титов А. Ф., Таланова В. В. Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. 203 с.
- Bakht J., Bano A., Dominy P. The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerance. II. Effect on plasma membrane structure and function // J. Exp. Bot. 2006. Vol. 57. P. 3707–3715.
- Catalá R., Salinas J. Temperature-perception, molecules and mechanisms // J. Appl. Biomed. 2010. Vol. 8. P. 189–198.
- Chen W. P., Li P. H. Membrane stabilization by abscisic acid under cold aids proline in alleviating chilling injury in maize (*Zea mays* L.) // Plant Cell Environ. 2002. Vol. 25. P. 955–962.
- Crosatti C., Rizza F., Badeck F. W., Mazzucotelli E., Cattivelli L. Harden the chloroplast to protect the plant // Physiol Plant. 2013. Vol. 147. P. 55–63.
- Flores-Nemede A. A., Dörffling K., Vergara B. S. Improvement of chilling resistance in rice by application of an abscisic acid analog in combination with the growth retardant tetracyclis // Plant Growth Regul. 1993. Vol. 12. P. 27–34.
- Gray C. G., Hansen M. R., Shau D. J., Graham K., Dale R., Natesan S. K. A., Newell C. A. Plastid stromules are induced by stress treatments acting through abscisic acid // Plant J. 2012. Vol. 69. P. 387–398.
- Kratsch H. A., Wise R. R. The ultrastructure of chilling stress // Plant Cell Environ. 2000. Vol. 23, № 4. P. 337–350.
- Saibo N. J., Lourenço T., Oliveria M. M. Transcription factors and regulation of photosynthesis and related metabolism under environmental stresses // Ann Botany. 2009. Vol. 103. P. 609–623.
- Theocharis A., Clément Ch., Barka E. A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures // Planta. 2012. Vol. 235. P. 1091–1105.
- Yamburenko M. V., Zubo Y. O., Vanková R., Kusnetsov V. V., Kulaeva O. N., Börner T. Absciscic acid represses the transcription of chloroplast genes // J. Exp. Bot. 2013. Vol. 64. P. 4491–4502.
- Zhou B., Guo Z., Lin L. Effects of abscisic acid application on photosynthesis and photochemistry of *Stylosanthes guianensis* under chilling stress // Plant Growth Regul. 2006. Vol. 48. P. 195–199.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Венжик Юлия Валерьевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
e-mail: Jul.Venzhik@gmail.com
тел.: (8142) 762712

Таланова Вера Викторовна

главный научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
e-mail: talanova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762712

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
руководитель лаб. экологической физиологии растений
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
e-mail: titov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769710

Мирославов Евгений Аркадьевич

главный научный сотрудник, д. б. н., проф.
Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН
ул. Проф. Попова, 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197376
e-mail: miroslavov@mail.ru
тел.: (812) 3464477

Venzhik, Yuliya

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: Jul.Venzhik@gmail.com
tel.: (8142) 762712

Talanova, Vera

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: talanova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762712

Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: titov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769710

Miroslavov, Evgeny

Komarov Botanical Institute,
Russian Academy of Sciences
2 Popova St., 197376 St. Petersburg,
Russia
e-mail: : miroslavov@mail.ru
tel.: (812) 3464477

УДК 581.13

ДИНАМИКА НЕСТРУКТУРНЫХ УГЛЕВОДОВ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ ДВУХЛЕТНИХ СЕЯНЦЕВ *BETULA PENDULA* И *BETULA PUBESCENCE* В ПЕРИОД ВЕГЕТАЦИИ

Н. А. Галибина¹, Е. Н. Теребова², Л. Л. Новицкая¹, И. Н. Софронова¹

¹ Институт леса Карельского научного центра РАН

² Петрозаводский государственный университет

На двухлетних сеянцах *Betula pendula* Roth и *B. pubescence* Ehrh показано, что береза повислая и береза пушистая уже на ранних этапах онтогенеза различаются между собой по стратегии распределения метаболитов. У *B. pubescence* в период активного камбиального роста больше метаболитов задерживается в кроне. У березы повислой обеих форм мощным аттрагирующим центром фотоассимилятов являются ткани ствола. Формирование проводящей системы идет на фоне высокого метаболического статуса. У *B. pendula* var. *pendula* повышение сахаров в ксилеме сопровождается формированием толстостенных сосудов с сильно лигнифицированными клеточными стенками. У *B. pendula* var. *carelica* интенсивное накопление сахарозы происходит в тканях флоэмы. Предполагается, что повышение у карельской березы сахаров во флоэме в период активного камбиального роста может нарушать камбиальную деятельность, приводя в будущем к формированию структурных аномалий древесины.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Betula pendula* Roth var. *carelica*, *B. pendula* var. *pendula*, *B. pubescence* Ehrh, сеянцы, сахароза, моносахара, крахмал.

**N. A. Galibina, E. N. Terebova, L. L. Novitskaya, I. N. Sofronova.
NONSTRUCTURAL CARBOHYDRATES DYNAMICS IN THE ORGANS AND
TISSUES OF TWO-YEAR-OLD SEEDLINGS OF *BETULA PENDULA* AND
BETULA PUBESCENCE DURING THE GROWING SEASON**

It was shown through the example of two-year-old seedlings of *Betula pendula* Roth and *B. pubescence* Ehrh that silver birch and downy birch differ from one another in the strategy of metabolites distribution already at early ontogenetic stages. In *B. pubescence*, more metabolites are retained in the crown during active cambial growth. Trunk tissues are powerful attracting centers for photoassimilates in both silver birch forms. A high metabolic status is the background for the formation of the conducting system. An accumulation of carbohydrates in *B. pendula* var. *pendula* results in the formation of thick-walled xylem vessels with strong lignified cellular walls. An intensive accumulation of sucrose in *B. pendula* var. *carelica* takes place in the phloem. Supposedly, an increase in sugar content in the phloem of Karelian birch in the period of active cambial growth can disrupt the cambial activity, resulting in the formation of structural anomalies of wood.

K e y w o r d s: *Betula pendula* Roth var. *carelica*, *B. pendula* var. *pendula*, *B. pubescence* Ehrh, seedlings, sucrose, monosaccharide, starch.

Введение

Карельская береза (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin)) является особой формой березы повислой (*Betula pendula* var. *pendula*) и ценится из-за своей древесины, отличающейся богатой палитрой оттенков и причудливыми узорами. По сравнению с другими древесными породами структурные аномалии тканей ствола у карельской березы выражены наиболее ярко, характеризуются большим разнообразием проявления в онтогенезе и высоким уровнем эндогенной изменчивости [Новицкая, 2008], в связи с чем она представляет собой интересный объект для исследований. Оригинальная текстура древесины карельской березы формируется в результате отклонений в деятельности камбия, которые связаны с понижением его активности и даже локальным отмиранием. При этом происходит интенсивное нарастание коры как за счет активизации камбиальных делений в сторону флоэмы, так и за счет повторных делений паренхимных клеток флоэмы первого-второго года жизни [Барильская, 1978; Novitskaya, Kushnir, 2006; Новицкая, 2008]. Поскольку карельская береза является формой березы повислой, представляет интерес сопоставить данные с другим представителем рода *Betula* березой пушистой (*B. pubescence* Ehrh), которая также широко распространена на территории Карелии.

В результате многолетних исследований был выявлен ряд физиолого-биохимических признаков, предшествующих и сопровождающих появление узорчатой древесины, на основании которых высказано предположение, что к нарушению деятельности камбия и формированию аномальных по строению проводящих тканей приводит повышенный уровень сахарозы в проводящей флоэме [Novitskaya, Kushnir, 2006; Новицкая, 2008; Novitskaya, 2009; Галибина и др., 2012]. Камбий – гетеротрофная ткань; расходуя на дыхание и обновление своих структур органические вещества, она нуждается в систематическом их пополнении за счет притока ассимилятов. В период активного роста, когда ткани ствола становятся мощным аттрагирующим центром, основным донором метаболитов выступают фотосинтезирующие листья. В связи с этим особый интерес представляет изучение особенностей донорно-акцепторных отношений органов и тканей растений в течение вегетационного сезона.

Формирование узорчатости у березы повислой проявляется в возрасте от 5–6 до 14–15 лет [Новицкая, 2008], однако любому морфологическому проявлению должны предшествовать фи-

зиолого-биохимические перестройки метаболизма, которые, как правило, не проявляются визуально. Известно, что общие изменения возникают на основе свойственного данному виду растения генетически обусловленного хода жизненных процессов в онтогенезе, но они могут существенно преобразоваться под влиянием внешних условий. Именно на ранних этапах онтогенеза ярко проявляется готовность организма специфически реагировать на то или иное индуцирующее воздействие как внутренней, так и внешней среды. Исходя из этого, исследование проводили на растениях второго года жизни.

Целью исследования было изучить содержание метаболитов углеводной природы в органах и тканях сеянцев двух форм березы повислой (обычной и карельской березы) и березы пушистой в периоды активного камбиального роста и подготовки растения к состоянию покоя.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись две формы березы повислой (*Betula pendula* Roth): обычная береза повислая (*B. pendula* var. *pendula*) и карельская береза (*B. pendula* var. *carelica*). Для получения межвидовой сравнительной характеристики использовались растения березы пушистой (*B. pubescence* Ehrh). Растения были выращены из семян, полученных в результате контролируемого опыления деревьев (Финляндия), в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН в 2 км от Петрозаводска (61°45' с. ш., 34°20' в. д.). Возраст исследуемых растений – 2 года. На этом этапе онтогенеза у растений карельской березы еще не выражены признаки узорчатой древесины. Во все даты отбора на биохимический анализ брали по 10–15 растений каждой формы березы повислой и березы пушистой.

Отбор образцов проводили в течение вегетационного сезона 2008 года:

- середина мая – раскрытие почек (активный ксилемный транспорт метаболитов из паренхимных клеток тканей ствола);
- конец июня – период камбиального роста на фоне интенсивного роста ауксибластов и формирования листьев второго поколения;
- середина июля – период активного камбиального роста, формирование вторичной клеточной стенки, клетки ксилемы становятся основной аттрагирующей зоной дерева, ориентирующей на себя отток фотоассимилятов;

– середина ноября – период затухания всех ростовых процессов, идет подготовка растений к состоянию покоя, замедление транспортных потоков.

Характеристика погодных условий (среднесуточная температура и количество осадков) приведена на рисунке 1.

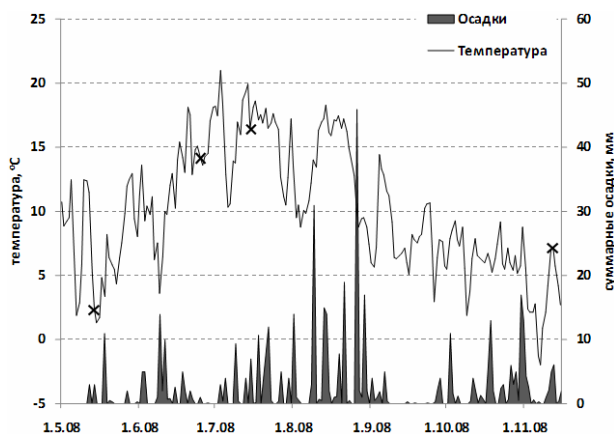


Рис. 1. Динамика среднесуточной температуры и суммарного количества осадков в течение мая–ноября 2008 года в г. Петрозаводске. Данные с сервера «Погода России» (<http://meteo.infospace.ru>). Метки обозначены даты отбора образцов

Для биохимического анализа отбирали листья (июнь, июль) и почки (май, ноябрь), из стволовой части препарировали ткани флоэмы (проводящая + непроводящая флоэма) и ткани ксилемы текущего года. Препарирование тканей контролировалось под световым микроскопом (10х18х10) фирмы «ЛОМО», Россия. Фиксацию растительного материала проводили жидким азотом с последующим лиофильным высушиванием.

В листьях, почках и тканях ствола определяли содержание моно-, ди- и олигосахаров. Выделение и экстракцию сахаров проводили по методике, которая подробно описана ранее [Галибина и др., 2012]. Содержание растворимых углеводов в экстракте анализировали на ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографической) системе серии «Стайер» («Аквион», Россия) при следующих условиях: колонка Rezex RCM-Monosaccharide («Phenomenex», США), элюент би-дистиллированная вода, скорость потока элюента – 0,6 мл/мин, детектор – рефрактометр. Критерием идентификации пиков служило время удерживания стандартных веществ: сахарозы, арабинозы, ксилозы, рамнозы, глюкозы, фруктозы, галактозы («Panreac», Испания). Содержание углеводов выражали в мг на г сухой ткани. В работе приведены данные по суммарному содержанию сахаров в исследуемых тканях, а также по содержанию сахарозы – основной транспортной

формы углеводов у березы [Новицкая, Галибина, 2011]. Химические анализы проводили при использовании оборудования Центра коллективного пользования ИЛ КарНЦ РАН «Аналитическая лаборатория».

В листьях, почках и в тканях флоэмы определяли содержание крахмала – полисахарида, выполняющего запасную функцию [Piispanen, Saranpää, 2001; Kaelke, Dawson, 2005; Regieer et al., 2010]. Крахмал из органов и тканей извлекали хлорной кислотой по методу Пьючера, его содержание определяли по количеству образованной в результате кислотного гидролиза глюкозы глюкозооксидазным методом.

На поперечных срезах побегов растений березы в конце вегетационного периода гистохимически определяли состояние развития годичных приростов флоэмы и ксилемы с использованием красителя крезилового прочного фиолетового (0,05%-й водный раствор) [Антонова и др., 1981].

Результаты экспериментов представлены на диаграммах в виде средней арифметической величины и стандартного отклонения.

Результаты

Содержание сахаров в листе

В середине мая в раскрывающихся почках, основном акцепторе метаболитов в этот период, у двух форм березы повислой общее содержание сахаров было значительно выше по сравнению с березой пушистой (рис. 2) и достигало ~11 мг/г сухой ткани. Содержание сахаров было высоким за счет сахарозы, количество которой в этот период в почках березы повислой достигало 6–8 мг/г. У березы пушистой общее количество сахаров составило ~1 мг/г, а сахароза практически не определялась.

В июне–июле погодные условия (среднесуточная температура ~15 °C и выше; умеренное количество осадков 5–10 мм) (см. рис. 1), вероятно, способствовали интенсивному росту и дифференциации тканей ствола у исследуемых растений. В листьях в июне суммарное содержание сахаров у обычной и карельской березы повислой было одинаковым (~6,5 мг/г), а у березы пушистой составило 4 мг/г (см. рис. 2). К середине июля общее количество сахаров у растений *B. pendula* var. *pendula*, *B. pendula* var. *carelica* и *B. pubescence* увеличивалось до 13,3; 16 и 17,7 мг/г соответственно. При этом если у березы повислой увеличение общего количества сахаров происходило за счет гексоз до 11–13 мг/г, то у березы пушистой наряду с увеличением гексоз (до 7,1 мг/г) существенно возрастало количество сахарозы (до 10,6 мг/г).

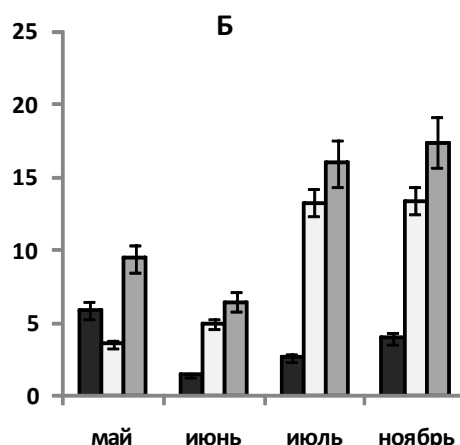
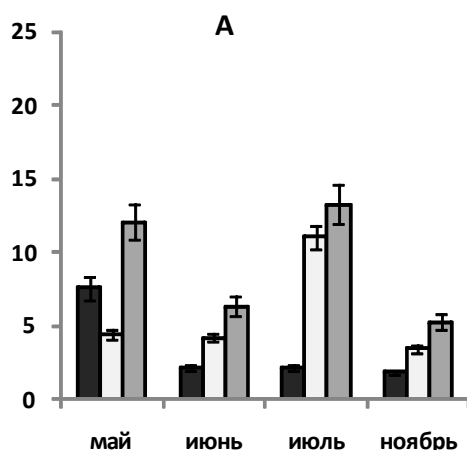
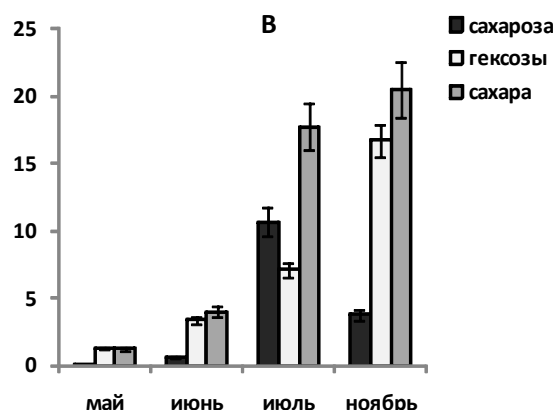


Рис. 2. Содержание сахарозы, гексоз, сахаров (мг/г сухой ткани) в почках (май, ноябрь) и листьях (июнь, июль) 2-летних сеянцев березы в течение вегетационного сезона. Здесь и на рис. 3, 4: А – *B. pendula* var. *pendula*, Б – *B. pendula* var. *carelica*, В – *B. pubescence*. На диаграммах показаны средние значения из 10–15 биологических повторностей. Бары – стандартное отклонение



В период подготовки растения к состоянию покоя среднесуточная температура колебалась в пределах 0–5 °С (см. рис. 1). В почках у березы пушистой и у карельской березы происходило накопление сахаров (до 20,5 и 17,4 мг/г у *B. pubescence* и у var. *carelica* соответственно). Увеличение содержания сахаров было в основном за счет возрастания количества гексоз до 16,7 мг/г у березы пушистой и 13,4 мг/г у карельской березы (см. рис. 2, Б, В). У обычной березы повислой общее количество сахаров, напротив, снижалось и составило всего 5,3 мг/г (см. рис. 2, А).

Содержание сахаров в стволе

В мае у *B. pendula* var. *pendula* количество сахаров во флоэме было примерно в 2 раза выше, чем у *B. pubescence* и у var. *carelica*, за счет высокого содержания как гексоз, так и сахарозы (рис. 3). В ксилеме в этот период сумма сахаров не превышала 1 мг/г у всех исследуемых растений (рис. 4).

Во флоэме дальнейшие изменения в количестве сахаров у обычной березы повислой и березы пушистой были схожи (см. рис. 3, А, В), общее их содержание постепенно увеличивалось с июня по ноябрь с 3–3,5 мг/г до 10–11 мг/г в основном за счет увеличения содержания гексоз. У карельской березы так-

же происходило возрастание сахаров, и их количество было больше (см. рис. 3, Б). Так, уже в июле суммарное содержание достигало 10,4 мг/г (причем увеличивалось оно как за счет гексоз, так и за счет сахарозы), а к ноябрю – 13,7 мг/г.

В тканях ксилемы, основном акцепторе фотоассимилятов в период активного роста, динамика была другая. Накопление сахаров, в основном за счет увеличения количества гексоз, у обеих форм березы повислой приходилось на июль. У var. *pendula* в тканях ксилемы метаболитов накапливалось больше – до 9 мг/г, в то время как у var. *carelica* – 4,5–5 мг/г. В период подготовки растений к покою в ксилеме березы повислой содержание сахаров было низким – 1,5–2 мг/г (см. рис. 4, А, Б). У березы пушистой в период активного роста суммарное содержание сахаров не превышало 2,6 мг/г. Некоторое увеличение сахаров происходило только в ноябре (4,4 мг/г), при этом существенно повышалось количество сахарозы (2,8 мг/г) (см. рис. 4, В).

Содержание крахмала

В мае у всех исследуемых растений содержание крахмала в распускающихся почках было минимальным и составило 1,4; 1,2 и 3 мг/г для березы пушистой, карельской и обычной березы повислой соответственно (рис. 5). Во флоэме,

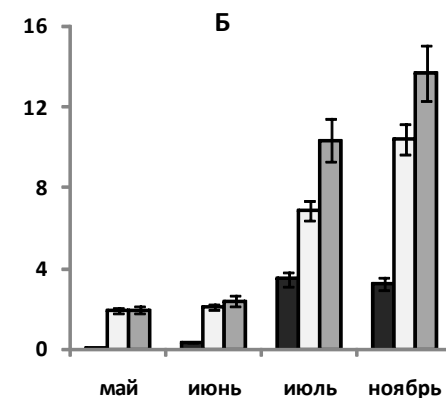
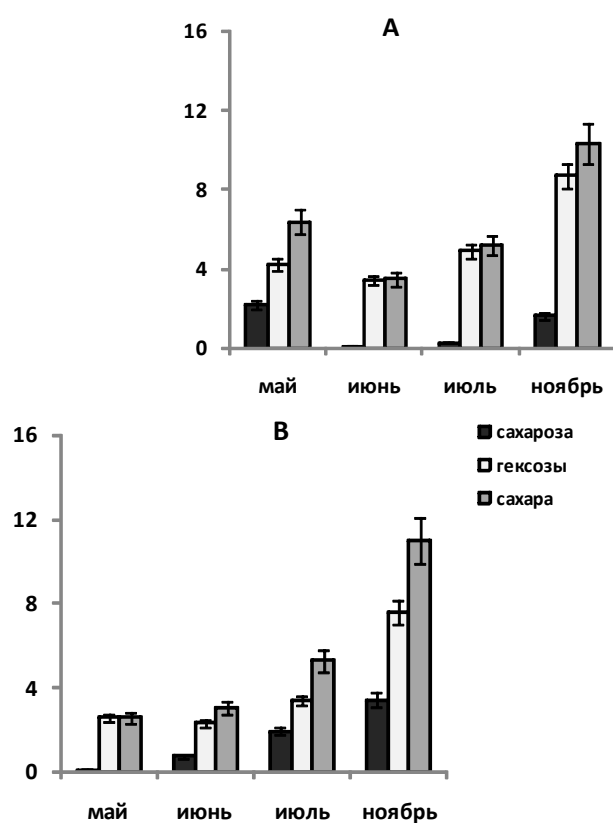


Рис. 3. Содержание сахарозы, гексоз, сахаров (мг/г сухой ткани) в тканях флоэмы 2-летних сеянцев березы в течение вегетационного сезона

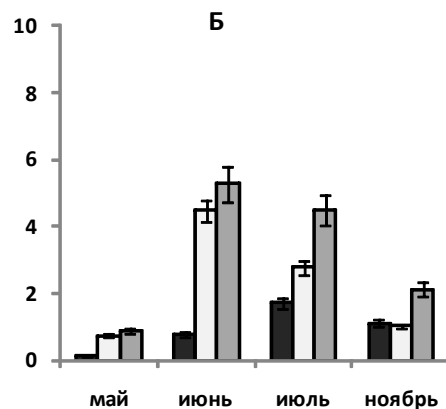
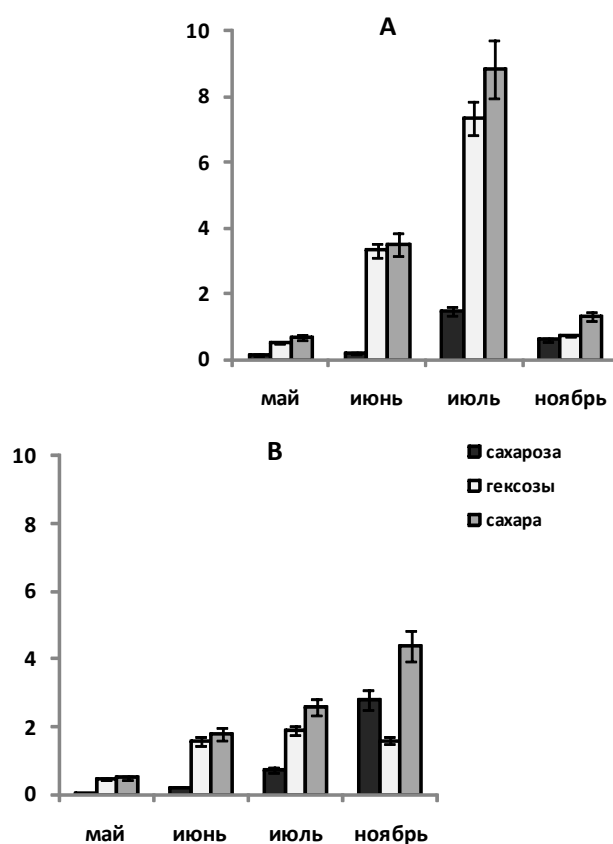


Рис. 4. Содержание сахарозы, гексоз, сахаров (мг/г сухой ткани) в тканях ксилемы 2-летних сеянцев березы в течение вегетационного сезона

напротив, количество крахмала в мае было самым высоким за весь период отбора: ~28 мг/г у березы повислой и 17 мг/г у березы пушистой.

На этапе активного роста содержание крахмала в листьях увеличивается. К июню его количество у всех исследуемых растений составляет ~4–

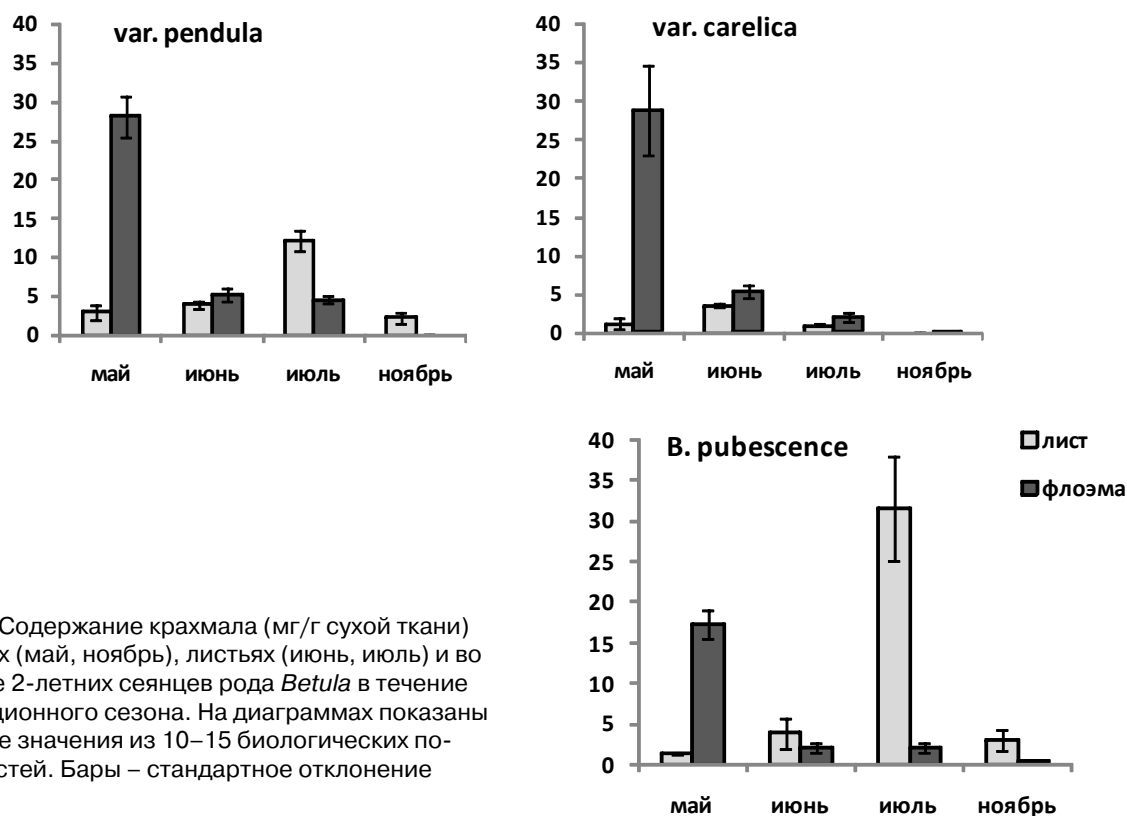


Рис. 5. Содержание крахмала (мг/г сухой ткани) в почках (май, ноябрь), листьях (июнь, июль) и во флоэме 2-летних сеянцев рода *Betula* в течение вегетационного сезона. На диаграммах показаны средние значения из 10–15 биологических повторностей. Бары – стандартное отклонение

5 мг/г; к середине июля у *B. pendula* var. *pendula* и у *B. pubescence* повышается до 12 и 32 мг/г соответственно, а у *B. pendula* var. *carelica* снижается почти до нуля. В тканях флоэмы в этот период количество крахмала было невысоким и колебалось в пределах 2–5 мг/г. Во время подготовки растений к состоянию покоя (ноябрь) накопления крахмала в почках и в тканях флоэмы исследуемых растений не происходило, его количество было близко к нулю (см. рис. 5).

Состояние развития годичных приростов флоэмы и ксилемы

Анатомические исследования показали, что склереиды в средней части толщи коры образуют кольцо, толщина которого у исследуемых растений значительно различалась. Кора карельской березы характеризовалась множественными сильно лигнифицированными склереидами, а у обычной березы повислой количество склере-

ид было меньше. Кроме того, в одних случаях кольцо было непрерывным (*B. pendula* var. *carelica* и var. *pendula*), в других – прерывистым (*B. pubescence*). В стволе карельской березы больше сосудов, причем в древесине первого года жизни. Появление синей окраски у сосудов ксилемы карельской березы позволило нам судить о большей степени их лигнификации. У *B. pubescence* степень лигнификации клеточных оболочек сосудов ксилемы меньше по сравнению с тем же показателем у березы повислой (табл.).

Обсуждение

Изучение динамики неструктурных сахаров в течение весны–осени 2008 года в тканях и органах у двухлетних растений березы показало, что данные изменения находятся в тесной связи с температурными годовыми циклами, и это неоднократно отмечалось в литературе

Некоторые анатомические показатели склереид коры и сосудов ксилемы 2-летних сеянцев березы

Вид и форма опытных растений	Склереиды коры				Сосуды ксилемы	
	Прерывистость склереидного кольца	Максимальная толщина слоя, мкм	Минимальная толщина слоя, мкм	Степень лигнификации оболочек	Количество на площадь 50x30 мкм	Степень лигнификации оболочек
<i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i>	Слой непрерывный	10,3 ± 1,2	4,3 ± 0,6	+++	23	+++
<i>B. pendula</i> var. <i>pendula</i>	Слой непрерывный	6,8 ± 0,4	2,2 ± 0,2	++	17	+++
<i>B. pubescence</i>	Отдельные скопления	6,1 ± 0,2	1,3 ± 0,3	+	19	+

[Piispanen, Saranpää, 2001; Groot, Wein, 2004; Saramäki, Hytönen, 2004; Pagter et al., 2008; Regieer et al., 2010].

В середине мая изучаемые растения находились в фазе распускания почек. Лист березы становится донором ассимилятов после достижения 50 % своего окончательного размера [Цельникер, Малкина, 1986], тогда и начинается активный флоэмный транспорт ассимилятов, поэтому в мае у березы проводящая флоэма еще бездействует. Однако в это время идет интенсивный ксилемный транспорт. Вода восходящего ксилемного потока поступает в клетки и ткани всего ствола. В цитоплазме паренхимных клеток, которыми особенно богата кора, активируется гидролиз запасных компонентов. Установлено, что в мае у всех исследуемых растений в тканях непроводящей флоэмы было самое высокое за весь сезон содержание крахмала (см. рис. 5). Весной, при отсутствии фотосинтезирующих листьев, растение использует углеводный резерв коры и древесины [Piispanen, Saranpää, 2001; Groot, Wein, 2004; Saramäki, Hytönen, 2004; Percival, Barnes, 2007]. Крахмал в этот период рассматривается как главный источник углерода и энергии для развивающихся почек и камбия [Галибина, 2003; Wong et al., 2003]. Гидролиз полимерных компонентов в коре приводит к повышению концентрации сахарозы. Основная масса сахарозы и полученные при ее расщеплении гексозы по градиенту концентрации перемещаются по апопласту до ксилемы и с ксилемным потоком поступают к развивающимся листьям, главным акцепторам в этот период. Проведенное исследование показало, что у двух форм березы повислой как содержание крахмала во флоэме, так и количество сахаров, поступающих из ствола в виде сахарозы к развивающимся почкам, значительно превосходят таковые у растений березы пушистой.

В период активных ростовых процессов (июнь, июль) основным донором метаболитов в растении становятся фотосинтезирующие листья, из которых ассимиляты по флоэме транспортируются к тканям ствола, где тратятся на рост и дифференциацию тканей флоэмы и ксилемы, на лигнификацию клеточных оболочек.

У карельской березы в этот период в листьях на фоне высокого количества сахаров (см. рис. 2, Б) не происходило накопления запасного полимера крахмала (см. рис. 5, Б), что может быть связано с интенсивным оттоком метаболитов в ствольную часть, в которой за счет гексоз существенно повышалось коли-

чество сахаров (см. рис. 3, Б; 4, Б). Соотношение количества гексоз к сахарозе является важным показателем, характеризующим направленность метаболизма. Так, смещение этого соотношения в сторону накопления гексоз наблюдается в интенсивно растущих тканях [Sturm, Tang, 1999; Iraqi, Tremblay, 2001]. Можно предположить, что у карельской березы в июле метаболизация сахарозы была выше в тканях флоэмы. Образующиеся гексозы являются субстратом для внутриклеточных синтезов не только углеводных полимеров, но и соединений липидной и фенольной природы. Окраска крезильовым прочным фиолетовым позволила обнаружить в коре карельской березы множество сильно лигнифицированных склереид (см. табл.). В результате исследований 40-летних растений березы повислой было установлено, что в тканях ксилемы карельской березы, по сравнению с обычной березой повислой, на фоне высокой активности пероксидазы [Галибина и др., 2013] выше жесткость структуры клеточной стенки за счет увеличения доли компонентов фенольной природы, как в составе лигнина, так и в виде поперечных диферуловых мостиков [Галибина, Теребова, 2014].

У обычной березы повислой и березы пушистой в листьях на фоне повышения в июле сахаров (см. рис. 2, А, В) происходило накопление крахмала (см. рис. 5, А, В). Первичный крахмал, образующийся при фотосинтезе, накапливается в хлоропластах в виде слоистых зерен различного размера и не может передвигаться из клетки в клетку. Высокое содержание крахмала в листьях в июле может свидетельствовать: (1) об интенсивном фотосинтезе листьев; (2) о том, что не все образующиеся сахара оттекают в ствол; часть из них, вероятно, представляющая избыток, временно депонируется в хлоропластах в виде крахмала. В литературе не раз отмечалось, что временное увеличение количества крахмала может быть связано со снижением акцептирующей силы тканей [Wong et al., 2003]. У обычной березы повислой накопление крахмала в листьях происходило на фоне высокого содержания сахаров в тканях ствола (см. рис. 3, А; 4, А), основная часть которых в виде моносахаров равномерно распределялась по тканям флоэмы и ксилемы, с преобладанием в ксилеме, где в этот период идет активный рост и утолщение клеточных оболочек. Можно предположить, что у *B. pendula* var. *pendula* значительная часть ассимилятов из листьев оттекает в ствольную часть, при этом основная метаболизация сахарозы идет в тканях ксилемы.

У сеянцев березы пушистой в стволе, напротив, количество углеводов было невысоким (см. рис. 3, В; 4, В). Еще одна особенность, не наблюдающаяся у растений березы повислой, – это существенное повышение сахарозы в листьях (см. рис. 2, В). Смещение соотношения гексозы / сахароза в сторону увеличения количества дисахарида может указывать на усиление функции запасаания [Wobus, Weber, 1999]. Возможно, у березы пушистой преобладание в листе метаболизма сахарозы является причиной меньшего ее содержания в тканях ствола. Это в свою очередь приводит к формированию ксилемы с меньшей степенью лигнификации клеточных оболочек (см. табл.).

Переход растений к состоянию покоя сопровождался повышением сахаров в тканях ствола, что, вероятно, связано с созданием зимнего резерва [Piispanen, Saranpää, 2001; Groot, Wein, 2004; Saramäki, Hytönen, 2004; Percival, Barnes, 2007]. Больше увеличение сахаров к началу зимы отмечалось у березы пушистой (см. рис. 3, В; 4, В). Ареал березы пушистой располагается севернее ареала березы повислой, что способствует формированию у нее особых механизмов морозоустойчивости, в частности, способности к накоплению веществ, обладающих криопротекторными свойствами. Таким образом, интенсивный отток сахаров в ткани ствола у березы пушистой в конце сезона можно рассматривать как защитный механизм от образования внутриклеточного льда и от обезвоживания в экстремальных условиях Севера.

Заключение

Проведенное нами исследование позволило предположить, что береза повислая и береза пушистая уже на ранних этапах онтогенеза различаются между собой по стратегии распределения метаболитов. У березы пушистой, вероятно, в период активного камбиального роста аттрагирующая сила ствола слабее, что в свою очередь приводит к накоплению углеводов в листьях. В результате в стволе формируются менее лигнифицированные клетки ксилемы по сравнению с березой повислой. У березы повислой обеих форм на протяжении всего периода активного камбиального роста мощным аттрагирующим центром фотоассимилятов является ствол и, вероятно, формирование проводящей системы идет на фоне высокого метаболического статуса. У обычной березы повислой равномерное распределение моносахаров по тканям ствола сопровождается формированием толстостенных сосудов ксилемы с сильно лигнифицированными клеточными стенками. У ка-

рельской березы интенсивное накопление сахарозы происходит в тканях флоэмы. Предполагается, что повышение у карельской березы сахаров во флоэме может нарушать камбиальную деятельность, приводя в будущем к формированию структурных аномалий древесины.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Проекта по Программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

Литература

- Антонова Г. Ф., Шебеко В. В. Использование крепкого прочного фиолетового при изучении образования древесины // Химия древесины. 1981. № 4. С. 102–105.
- Барильская Л. А. Сравнительный структурный анализ древесины березы повислой и карельской березы: дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 1978.
- Галибина Н. А. Клеточная стенка хвои деревьев сосны обыкновенной и ели сибирской в условиях аэротехногенного загрязнения: автореферат дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2003. 19 с.
- Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Софронова И. Н. Динамика сахаров в тканях ствола *Betula pendula* (Betulaceae) при выходе из зимнего покоя // Растительные ресурсы. 2012. Т. 48, № 4. С. 554–564.
- Галибина Н. А., Целищева Ю. Л., Андреев В. П., Софронова И. Н., Никерова К. М. Активность пероксидазы в органах и тканях деревьев березы повислой // Ученые записки ПетрГУ, сер. Естеств. и техн. науки. 2013. № 4. С. 7–13.
- Галибина Н. А., Теребова Е. Н. Физико-химические свойства клеточных стенок тканей ствола деревьев *Betula pendula* Roth // Ученые записки ПетрГУ, сер. Естеств. и техн. науки. 2014. № 4. С. 19–25.
- Новицкая Л. Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий / Рос. акад. наук, Карел. науч. центр, Ин-т леса. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.
- Новицкая Л. Л., Галибина Н. А. Транспортная и запасная формы сахаров у березы повислой (*Betula pendula* Roth) // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды: материалы междунар. конф. Петрозаводск, 2011. С. 230–236.
- Цельникер Ю. Л., Малкина И. С. Баланс органического вещества в онтогенезе листа у лиственных деревьев // Физиология растений. 1986. Т. 33, № 5. С. 935–940.
- Groot W. J., Wein R. W. Effects of fire severity and season of burn on *Betula glandulosa* growth dynamics // International Journal of Wildland Fire. 2004. Vol. 13. P. 287–295.
- Iraqi D., Tremblay F. M. The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos // Physiologia Plantarum. 2001. Vol. 111, N 3. P. 381–388.

Kaelke C. M., Dawson J. O. The accretion of nonstructural carbohydrates changes seasonally in *Alnus incana* ssp. *rugosa* in accord with tissue type, growth, N allocation, and root hypoxia // *Symbiosis*. 2005. Vol. 39. P. 61–66.

Novitskaya L. L. Effect of sucrose on sclerification of bark cells in *Betula pendula* Roth // *Acta Horticulturae*. 2009. Vol. 835. P. 109–116.

Novitskaya L. L., Kushnir F. V. The role of sucrose in regulation of trunk tissue development in *Betula pendula* Roth // *Journal of Plant Growth Regulation*. 2006. Vol. 25. P. 18–29.

Pagter M., Jensen C. R., Petersen K. K., Liu F., Arora R. Changes in carbohydrates, ABA and bark proteins during seasonal cold acclimation and deacclimation in *Hydrangea* species differing in cold hardiness // *Physiologia Plantarum*. 2008. Vol. 134. P. 473–485.

Percival G. C., Barnes S. The influence of carbohydrates, nitrogen fertilizers and water-retaining polymer root dips on survival and growth of newly transplanted bare-rooted silver birch (*Betula pendula* Roth.) and european beech (*Fagus sylvatica* L.) // *Arboricultural Journal*. 2007. Vol. 30. P. 223–244.

Piispänen R., Saranpää P. Variation of non-structural carbohydrates in silver birch (*Betula pendula* Roth) wood // *Trees*. 2001. Vol. 15. P. 44–451.

Regierer N., Streb S., Zeeman S. C., Frey B. Seasonal changes in starch and sugar content of poplar (*Populus deltoids* x *nigra* cv. Dorskamp) and the impact of stem girdling on carbohydrate allocation to roots // *Tree Physiology*. 2010. Vol. 30. P. 979–987.

Saramäki J., Hytönen J. Nutritional status and development of mixed plantations of silver birch (*Betula pubescens* Ehrh.) on former agricultural soils // *Baltic Forestry*. 2004. Vol. 10. P. 2–11.

Sturm A., Tang G.-Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning // *Trends Plant Sci*. 1999. N 4. P. 401–407.

Wobus U., Weber H. Sugars as signal molecules in plant seed development // *Biological Chemistry*. 1999. Vol. 380. P. 937–944.

Wong B. L., Baggett K. L., Rye A. H. Seasonal patterns of reserve soluble carbohydrates in mature sugar maple (*Acer saccharum*) // *Can. J. Bot*. 2003. Vol. 81. P. 780–788.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Галибина Наталия Алексеевна

зав. аналитической лабораторией, к. б. н.
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Карелия,
Россия, 185910
эл. адрес: galibina@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

Galibina, Natalia

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: galibina@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 768160

Теребова Елена Николаевна

доцент кафедры ботаники и физиологии растений, к. б. н.,
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, г. Петрозаводск, Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: eterebova@gmail.com

Terebova, Elena

Petrozavodsk State University
33 Lenina St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: eterebova@gmail.com

Новицкая Людмила Львовична

зав. лаб. физиологии и цитологии древесных растений,
д. б. н.
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, Карелия, Россия
эл. адрес: ludnovits@rambler.ru

Novitskaya, Lyudmila

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ludnovits@rambler.ru

Софронова Ирина Николаевна

ведущий биолог лаб. физиологии и цитологии
древесных растений
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: irinasof@krc.karelia.ru

Sofronova, Irina

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: irinasof@krc.karelia.ru

УДК 639.3.07

РОСТ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ МАЛЬКОВ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ В САДКОВОМ ХОЗЯЙСТВЕ КАРЕЛИИ

И. М. Дзюбук, Л. П. Рыжков

Петрозаводский государственный университет

Приведены результаты выращивания мальков радужной форели, полученных от местных производителей из садкового хозяйства Кондопожской губы Онежского озера. Показана возможность выращивания мальков как в бассейнах, так и в садках при высоких величинах выживаемости (до 96 %). Установлена периодичность скорости роста мальков, обусловленная условиями среды и закономерностями онтогенеза. Рекомендованы границы благоприятных условий выращивания мальков: верхний предел температуры воды – 19,5 °C (оптимум 14–16 °C), нижний предел содержания кислорода в воде – 6,5 мг/л, диапазон величин pH – 6,8–7,8.

К л ю ч е в ы е с л о в а: садковое рыбоводство, форель, мальки, посадочный материал, рост, выживаемость, Онежское озеро.

I. M. Dzyubuk, L. P. Ryzhkov. GROWTH AND SURVIVAL OF RAINBOW TROUT FINGERLINGS IN A FISH FARM IN KARELIA

The results of rearing rainbow trout fingerlings obtained from local bloodstock from a cage farm in Kondopozhskaya Bay of Lake Onega are presented. The feasibility of growing fingerlings both in pools and in cages at high survival rates (up to 96 %) is demonstrated. Cycles in larval growth rates, caused by environmental conditions and ontogenetic patterns, were found. The borders of favorable growing conditions for the whitebaits are recommended. The upper limit of favorable temperature for the fingerlings is 19.5 °C (optimum at 14–16 °C), the lower limit of oxygen concentration in water is 6.5 mg/l, favorable pH is 6.8–7.8.

Key words: cage fish breeding, trout, fingerlings, stocking material, growth, survival, Lake Onega.

Введение

Садковое рыбоводство в естественных водоемах Карелии интенсивно развивается. В 2013 году производство рыбной продукции в садках достигло 23,5 тыс. тонн, что в 8,9 раза превышает величину промысла во внутренних водоемах. Развитию садкового рыбоводства способствуют благоприятные природные, социальные и экономические условия. Дальней-

шее развитие этого направления будет определяться не только экологическими и экономическими возможностями, а качеством посадочного материала [Рыжков, Дзюбук, 2013]. В Карелии создаются специализированные хозяйства по производству посадочного материала, но все еще значительное его количество приобретает у зарубежных поставщиков, что создает ряд сложностей не только экономического, но и биологического характера. От стои-

мости посадочного материала и от его здоровья во многом зависит конечный результат получения качественной рыбной продукции. Поэтому актуальны и требуют решения проблемы дополнительного производства и использования отечественного посадочного материала хорошего качества. Для решения этой проблемы резервом может стать посадочный материал, полученный от производителей, выращенных непосредственно в садковых хозяйствах.

Для изучения этой проблемы были проведены специальные исследования по выращиванию мальков радужной форели, полученных от местных производителей, в различных условиях (бассейн, садок).

Материалы и методы

Исследовались мальки радужной форели (*Parasalmo mykiss irideus*), полученные от производителей, выращенных в садковом хозяйстве, расположенном на Онежском озере (Кондопожская губа). Опытные работы выполнялись в июне 2011 года. Возраст мальков был около 1,5 месяца. Исходная масса тела – 0,21 г. Мальки выращивались в бассейне с проточной водой и в садке, размещенном в озере. В бассейн было помещено 125 тыс. особей, в садок – 83 тыс. Соответственно плотность посадки была 7484 и 6640 шт./м³.

На протяжении исследований активная реакция воды (рН) в бассейне и садке была сходная, величина ее колебалась в пределах 7,2–7,9 (в среднем 7,5), что соответствует оптимальным условиям выращивания. Содержание кислоро-

да было в пределах благоприятных концентраций – 6,7–8,3 мг/л (рис. 1). Температура воды колебалась от 14 до 20 °С (рис. 2), то есть изменялась в пределах верхнего диапазона благоприятных температур. Известно, что оптимальная температура воды для выращивания мальков форели – 14–16 °С. Она может быть увеличена в благоприятном диапазоне до 18 °С. При ее подъеме выше 20 °С, то есть за пределы благоприятной, мальки чувствуют себя угнетенно, прекращают питаться и, соответственно, не растут. Одновременно сокращается их выживаемость [Титарев, 1980; Цуладзе, 1990; Рыжков, Кучко, 2008].

Кормили мальков вручную, 18 раз в сутки. Величина суточного рациона определялась по таблицам фирмы Rehu Raisio, корм которой и использовался в опытах. В зависимости от массы тела и температуры воды величина суточного рациона за период исследования увеличилась от 18 до 396 г. Размер крупки корма постепенно возрастал от 0,1 до 1,0 мм. Поедаемость корма мальками была высокой (90–95 %).

Для определения темпа роста мальки взвешивались и измерялись каждые 4 дня. На основании полученных результатов рассчитывались величины абсолютного прироста и индекс соотношения (ИС) [Рыжков, 2009]. Погибшие мальки выбирались ежедневно (не реже двух раз в день).

На морфологический анализ было использовано 400 мальков. Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных методов вариационной статистики [Ивантер, Коросов, 2003].

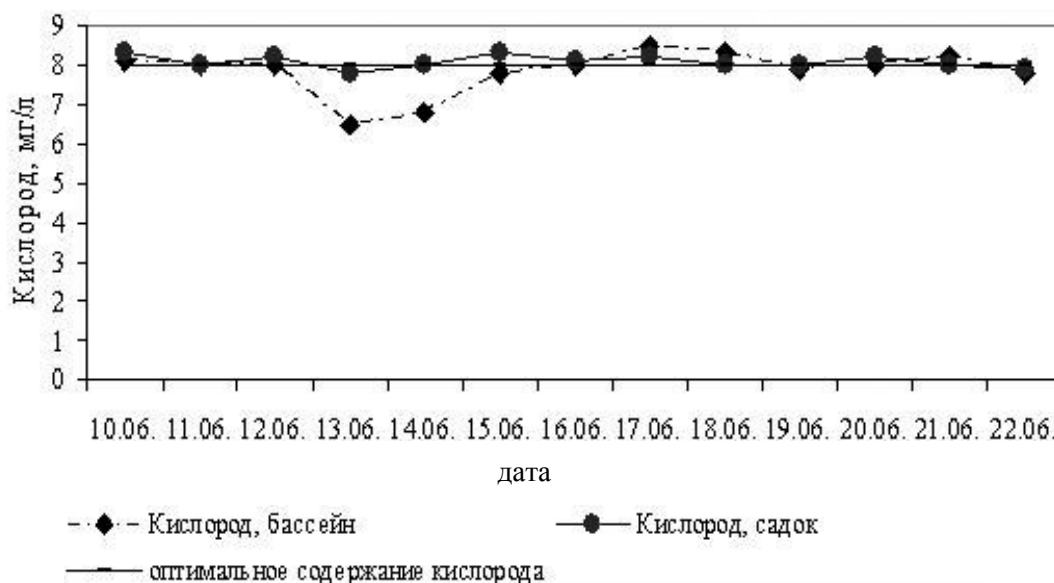


Рис. 1. Изменение содержания кислорода в воде форелевого хозяйства (Кондопожская губа Онежского озера), 2011 г.

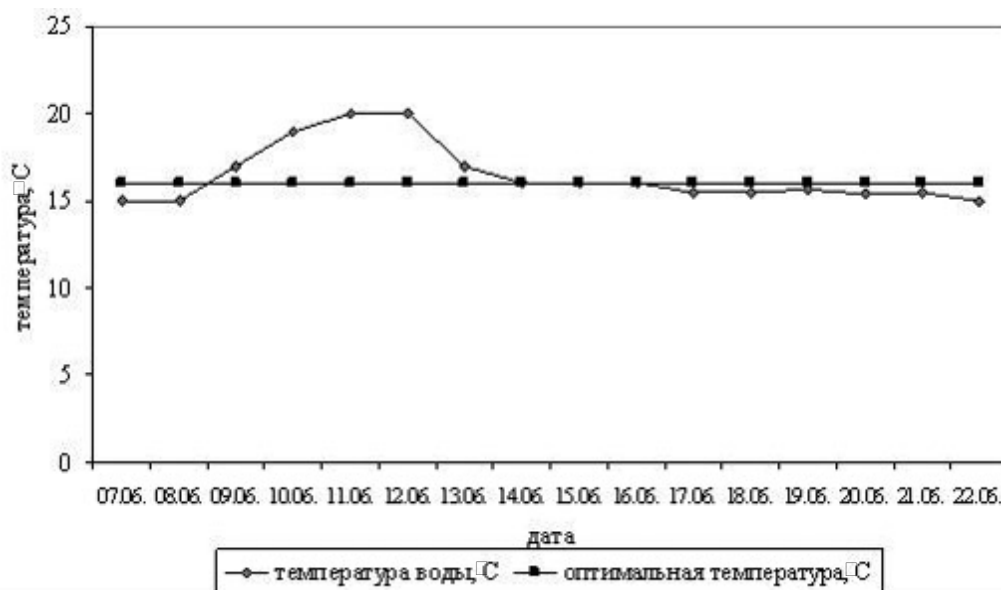


Рис. 2. Изменение температуры воды в форелевом хозяйстве (Кондопожская губа Онежского озера), 2011 г.

Результаты и обсуждение

Результаты измерения массы тела и размеров мальков, выращиваемых в различных рыбоводных емкостях, приведены на рисунке 3. За период исследования (15 дней) масса тела мальков в бассейне увеличилась от 0,21 до 0,47 г, а их размеры возросли от 2,4 до 3,7 см. При выращивании в садке эти изменения были соответственно от 0,21 до 0,44 г и от 2,2 до 3,5 см. В садке масса тела мальков возросла на 0,26 г, а длина тела – на 1,3 см. Эти же показатели в бассейне –

0,23 г и 1,3 см. Наблюдаемые незначительные различия в приросте массы тела мальков в садке и бассейне оказались статистически недостоверными. Следовательно, испытанные рыбоводные емкости (садки и бассейны) полностью пригодны для выращивания мальков форели. Это значит, что, несмотря на высокую чувствительность к условиям среды мальков форели в этот ответственный период онтогенеза, их можно выращивать не только в бассейнах, но и в садках.

Однако при общем сходстве исследуемых параметров, как показывают результаты, на

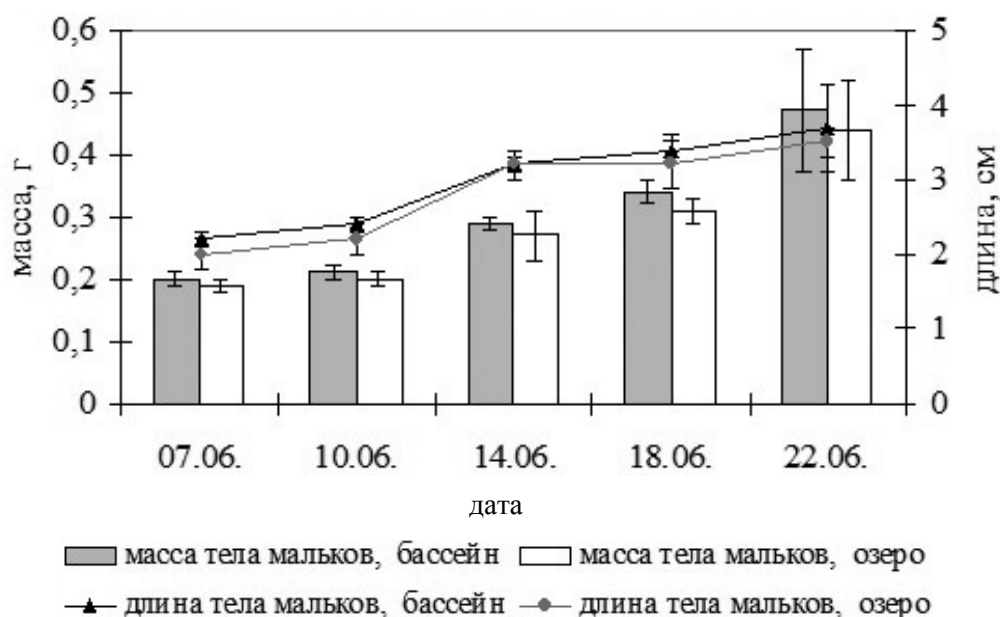


Рис. 3. Изменение массы тела и длины тела мальков форели в бассейне и садке (озеро) в форелевом хозяйстве (Кондопожская губа Онежского озера), 2011 г.

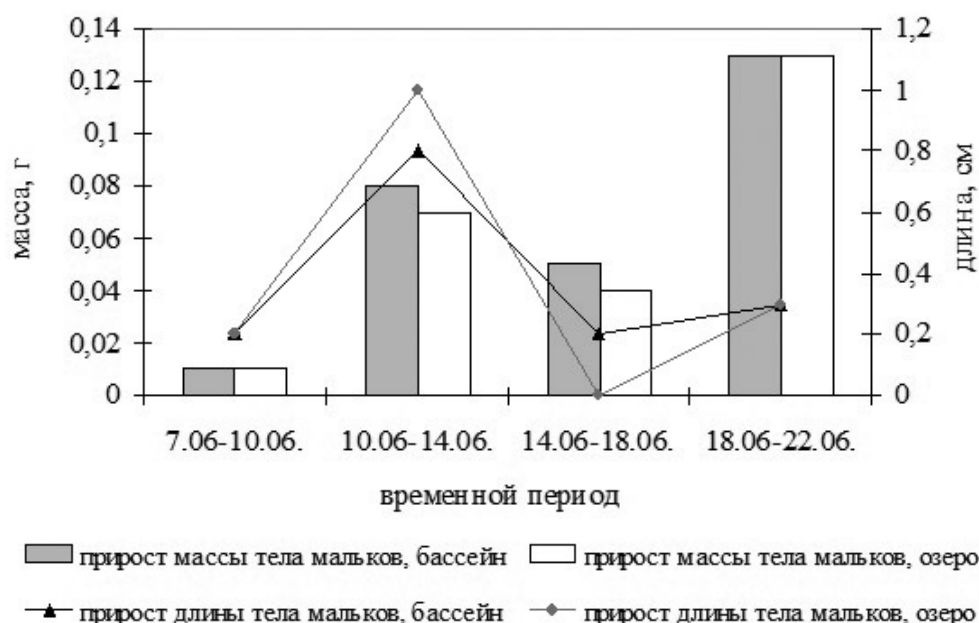


Рис. 4. Прирост массы тела и длины тела мальков радужной форели в бассейне и садке (озеро) в форелевом хозяйстве (Кондопожская губа Онежского озера), 2011 г.

протяжении всего периода исследования интенсивность роста мальков оказалась неодинаковой. Это хорошо показывает динамика величины прироста мальков за каждые четыре дня выращивания (рис. 4).

В первые дни выращивания (7–10 июня) отмечен минимальный прирост массы и размеров тела. В бассейне и садке их величины оказались одинаковыми (масса – 0,01 г, длина – 0,2 см). Причем, судя по величине индекса соотношения (ИС), продолжалось преобладание накопления массы тела над линейным ростом (ИС 17,0). В этот период кислородный и температурный режимы содержания были на оптимальном уровне (см. рис. 1 и 2).

В период с 10 по 14 июня прирост массы и размеров тела в обеих группах мальков существенно увеличился. В бассейне прирост массы тела возрос до 0,08 г, размеров – до 0,8 см. В садках данные показатели равнялись соответственно 0,07 г и 1,0 см. В этот период началось преобладание линейного роста (ИС 12,0). Содержание кислорода в воде бассейна в это время было минимальным (6,7 мг/л), в садке – несколько выше (7,8 мг/л), а температура воды была максимальной (19,8 °C). Несмотря на то что мальки форели в это время выращивались в пограничных условиях благоприятных интервалов, накопленные энергетические ресурсы при минимальном росте на предыдущем этапе создали базу для интенсификации процессов метаболизма.

Последующие этапы выращивания мальков проходили в оптимальных условиях. Однако скорость их роста также периодически изменялась.

В период с 14 по 18 июня рост был замедлен (см. рис. 4). В бассейне прирост массы тела мальков составил всего лишь 0,05 г, сократившись по сравнению с предыдущим периодом в 1,6 раза. Линейные размеры сократились в 4 раза и составили 0,2 см. В садке прирост массы тела мальков также сократился до 0,04 г, уменьшившись в 1,75 раза относительно предыдущего периода. Прирост их линейных размеров стал близок к нулю.

На заключительном этапе эксперимента (с 18 по 22 июня) прирост массы тела мальков в обоих вариантах опыта достиг максимальных значений (0,13 г), увеличившись по сравнению с предыдущим периодом в 2,6 раза. Возросла величина прироста длины тела от 0 (в предыдущий период) до 0,3 см.

Конечно, изменения темпа роста мальков форели в определенной степени связаны с динамикой температурного и газового режимов. Снижение содержания кислорода до нижнего предела благоприятной зоны и увеличение температуры до ее верхнего предела отразились на росте рыб. Однако нельзя исключать наличия существующей периодичности (этапности) в развитии организмов, чередования интенсивности линейного и весового роста. Ранее было показано, что в онтогенезе рыб существуют переходные стадии с очень низкой скоростью роста и этапы с высокой скоростью роста и что в процессе развития рыб происходит чередование скорости линейного и весового роста [Рыжков, 1984, 2009, 2010]. Эта проблема весьма важна и заслу-

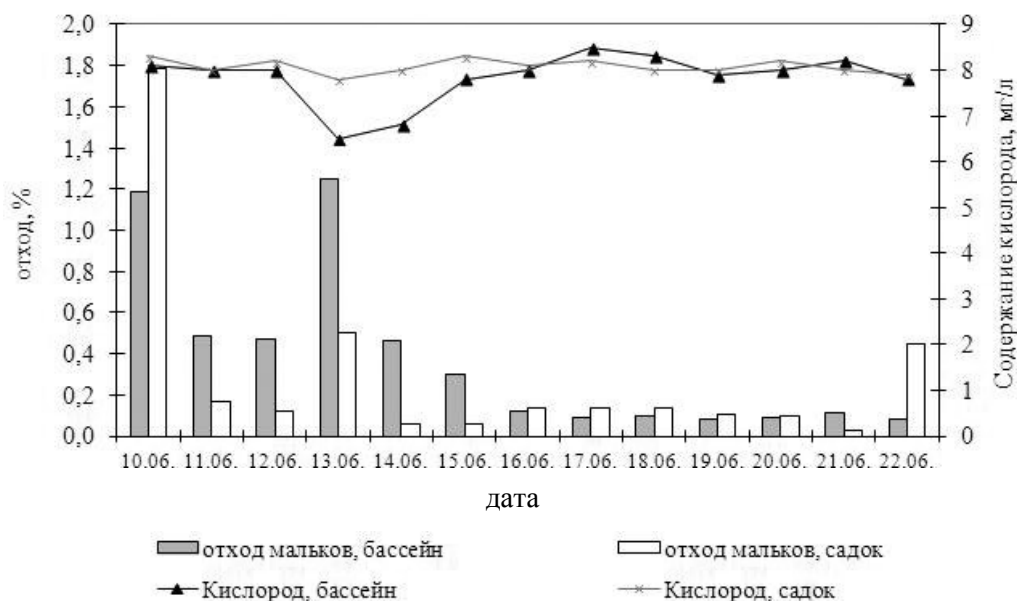


Рис. 5. Отход мальков в бассейне и садке (озеро) в форелевом хозяйстве (Кондопожская губа Онежского озера), 2011 г.

живает специального исследования, особенно периодичности роста рыб, выращиваемых в искусственных условиях.

О значении исследуемых факторов среды для состояния мальков можно также судить по их выживаемости (рис. 5). В период исследования выживаемость мальков была высокой. В бассейне она равнялась 95,2 %, а в садке даже 96,2 %. Нормативная выживаемость для молоди форели составляет 85 % [Рыжков, Кучко, 2008]. Однако во время исследования этот процесс осуществлялся неравномерно. Было отмечено две вспышки гибели мальков (10 и 13 июня). В первом случае их погибло 1,2 %, во втором – 1,3 %. По времени вспышки совпали с нарушением подачи воды в рыбоводные сооружения (см. рис. 1, 2, 5). В результате этого произошло увеличение мутности воды, ухудшилась проточность, вода приобрела темно-зеленый цвет из-за интенсивного развития фитопланктона, что ухудшило потребление кислорода мальками.

Заключение

Результаты проведенного исследования доказывают целесообразность получения посадочного материала форели от местных производителей в карельских рыбоводных хозяйствах. Такой посадочный материал хорошо адаптирован к местным условиям, не подвергается стрессовым нагрузкам перевозок и изолирован от возможности инфекционных заболеваний. Выращивать мальков возможно как в бассейнах, так и в садках, размещаемых в открытом водоеме. Верхний предел благо-

приятной температуры для мальков – 19,5 °C (оптимум 14–16 °C), нижний предел содержания кислорода – 6,5 мг/л, диапазон благоприятных величин pH – 6,8–7,8.

Литература

- Ивантер Э. В., Коросов А. В. Введение в количественную биологию. Учебное пособие для студентов биол. специальности. Петрозаводск: Петрозаводский гос. ун-т, 2003. 302 с.
- Рыжков Л. П. Основные морфофизиологические закономерности раннего онтогенеза пресноводных рыб // Биологические основы рыбоводства. М.: Наука, 1984. С. 6–27.
- Рыжков Л. П., Кучко Т. Ю. Садковое рыбоводство. Петрозаводск: ПетрГУ, 2008. 164 с.
- Рыжков Л. П. Экологические аспекты динамики соотношения величин массы и размеров тела окуня // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: матер. XXVIII междунар. конф. Петрозаводск, 2009. С. 475–478.
- Рыжков Л. П. Динамика роста плотвы (*Rutilus rutilus* L.) в северных озерах // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: матер. междунар. конф. Петрозаводск: Институт биологии КарНЦ РАН, 2010. С. 159–161.
- Рыжков Л. П., Дзюбук И. М. Возможности развития индустриальной аквакультуры в Карелии // Интенсивная аквакультура на современном этапе развития: научно-практич. конф. с междунар. участием. (Махачкала, 1–4 окт. 2013 г.). Махачкала: Эко-пресс. 2013. С. 182–186.
- Титарев Е. Ф. Форелеводство. М.: Пищевая промышленность, 1980. 34 с.
- Цуладзе В. Л. Бассейновый метод выращивания лососевых рыб: на примере радужной форели. М: Агропромиздат, 1990. 156 с.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Дзюбук Ирина Михайловна

доцент

Петрозаводский государственный университет,
кафедра зоологии и экологии ЭБФ
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: ikrup@petrsu.ru
тел.: (8142) 781741

Рыжков Леонид Павлович

профессор

Петрозаводский государственный университет,
кафедра зоологии и экологии ЭБФ
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Карелия, Россия, 185910

Dzyubuk, Irina

Petrozavodsk State University, chair of zoology and ecology
33 Lenina St., 185910, Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ikrup@petrsu.ru
tel.: (8142) 781741

Ryzhkov, Leonid

Petrozavodsk State University, chair of zoology and ecology
33 Lenina St., 185910, Petrozavodsk, Karelia, Russia

УДК 635.52: 581.1

ФОТОПЕРИОДИЧЕСКАЯ И ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ФАСОЛИ (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) В УСЛОВИЯХ СЕВЕРО-ЗАПАДА РФ

**М. А. Вишнякова, В. А. Кошкин, Г. П. Егорова, Л. Ю. Новикова,
И. И. Матвиенко**

*Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н. И. Вавилова
Россельхозакадемии*

Проведен скрининг 98 образцов фасоли из коллекции ВИР по фотопериодической чувствительности (ФПЧ) в условиях Ленинградской области. Большая часть образцов задерживали цветение на длинном дне по сравнению с коротким в среднем за пять лет на 4,5 сут. Определен коэффициент ФПЧ, рассчитываемый по отношению продолжительности периода «всходы – цветение» на длинном и коротком дне. По значению $K_{ФПЧ}$ (0,97–2,11) среди исследованных образцов преобладали сорта с почти нейтральной реакцией на фотопериод. Показано, что фаза цветения на длинном дне наступает после накопления определенных сумм эффективных температур ($T_{эф15}$). Значительная задержка цветения (на 10,5 сут) в годы с меньшими суммами эффективных температур по сравнению с более теплыми годами свидетельствует о значительном влиянии температурного фактора на индукцию цветения фасоли на Северо-Западе РФ.

К л ю ч е в ы е с л о в а: фасоль, фотопериод, температура воздуха, фотопериодическая чувствительность, период «всходы – цветение».

**M. A. Vishnyakova, V. A. Koshkin, G. P. Egorova, L. Yu. Novikova,
I. I. Matvienko. THE PHOTOPERIOD AND TEMPERATURE SENSITIVITY
OF COMMON BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) IN THE NORTH-WEST
OF RUSSIA**

98 samples of common beans from the Vavilov Institute collection have been screened for photoperiod sensitivity in the Leningrad region. Most of the samples delayed flowering in a long-day, compared to a short-day mode, by an average of 4.5 days in five years. The coefficient of photoperiod sensitivity (CPS) was determined. It was calculated as the long-day/short-day ratio for the “sprouting to flowering” period. According to the CPS value (0.97–2.11), the varieties with almost neutral reaction to photoperiod dominated among the chosen samples. It was shown that the phase of flowering began after the accumulation of certain sums of effective temperatures (T_{ef15}). A significant delay in flowering (10.5 days) on long days in cooler years, compared to warmer ones, was detected. It suggests that the temperature factor is of critical importance for the induction of flowering of common beans in the North-West of Russia.

Key words: common beans, photoperiod, air temperature, photoperiodic sensitivity, “days of sprouting to days of flowering” period.

Введение

Фасоль – растение теплого климата и короткого дня. В горных ущельях мезо- и южно-американского центров происхождения культуры до сих пор растут многолетние лианы вида *P. vulgaris* – предки современных культурных представителей фасоли [Beebe et al., 1997; Gept, 1998, 2004]. За многие века народной селекции фасоль претерпела целый ряд изменений, составивших ее синдром доместикации. Признаками, приобретенными в процессе доместикации, у фасоли стали: изменение характера роста стебля, увеличение размеров бобов и семян, уменьшение периода покоя семян, укороченный период вегетации, изменение чувствительности к фотопериоду, увеличение уборочного индекса и др. [Koinange et al., 1996].

Поистине революционные события в селекции фасоли произошли за последнее столетие, когда она получила широкое распространение за пределами центров происхождения. Ее агрономический ареал продвинулся в высокие северные широты (до 60–65° с. ш.), и культура адаптировалась не только к сравнительно ограниченными тепловым ресурсам, но и к неблагоприятной для нее длине дня. Появились новые экотипы фасоли, обладающие детерминантным типом роста стебля и кустовым габитусом растения. У этих экотипов значительно сократились вегетационный период и его составляющие, синхронизировались цветение и созревание бобов. Значительное сокращение периода «всходы – цветение» означает более ранний переход растения от вегетативной к генеративной стадии – процесс, определяемый фотопериодической чувствительностью (ФПЧ) растения.

Изучение характера наследования чувствительности к длине дня у фасоли выявило в ее генофонде, как и у большинства изученных в этом отношении растений, три группы генотипов: чувствительные, с почти нейтральной реакцией (слабочувствительные) и с промежуточным типом реагирования [Kornegay et al., 1993].

Для продвижения в более северные широты теплолюбивых и короткодневных культур необходимо создавать слабочувствительные к фотопериоду сорта, а также знать воздействие на культуру температурного фактора вообще и по отношению к фотопериоду в частности.

Работы по изучению ФПЧ фасоли впервые в мире были осуществлены в ВИР в первой трети, а затем продолжены в середине XX века. В исследование были включены разные виды

фасоли. Показано влияние длины дня на период «всходы – цветение» у короткодневных и длиннодневных растений [Дорошенко, Разумов, 1926]. Выявлена дифференциация генофонда по отношению к фотопериоду, его чрезвычайное разнообразие по реакции на длину дня и показаны возможные изменения фенотипа растений фасоли в неблагоприятных для них условиях фотопериода [Иванов, 1961]. Долгое время подобные исследования не проводились. Между тем выявление слабочувствительных к фотопериоду образцов становится все более актуальным. Потребности культуры к теплу в условиях Северо-Запада РФ также не изучались, если не считать работ по холодостойкости проростков фасоли [Алексеева, Буданова, 1985; Алексеева, Петрова, 1995]. Практически ничего не известно и о совместном воздействии на фасоль фотопериода и температурного фактора. Поэтому целью данной работы явилась оценка фотопериодической и температурной чувствительности сортов фасоли из коллекции ВИР, являющейся репрезентативной выборкой мирового разнообразия культуры и служащей исходным материалом для селекции.

Материал и методы

Материалом служили 98 образцов фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L.) из коллекции ВИР. Исследование проводили в 2008–2012 гг. Ежегодно анализировали по 19–20 образцов.

В изучаемую выборку вошли селекционные сорта из 28 стран мира, производящих фасоль в промышленных масштабах и расположенных в интервале 50° ю. ш. – 60° с. ш. и 130° з. д. – 135° в. д. Происхождение отечественных образцов фасоли отражало ее агрономический ареал в Российской Федерации и включало сорта селекции Дальнего Востока, Сибири, регионов европейской части (табл. 1). Большинство образцов обладали детерминантным типом роста стебля (кустовой морфотип), 19 образцов – индетерминантным (вьющийся и полувьющийся морфотипы). Были представлены разные направления использования культуры: зерновое, овощное и универсальное с преобладанием первого как наиболее распространенного. Разнообразие по указанным параметрам соблюдали в каждом наборе образцов, подбираемых для ежегодных исследований.

Опыты проводили в вегетационных и фотопериодических павильонах отдела физиологии Пушкинских лабораторий ВИР. Сроки посева варьировали в пределах одного-двух дней: 27–29 мая.

Растения выращивали на дерново-подзолистой почве в пластиковых 5-литровых сосудах – по пять нормально развитых растений на сосуд. Удобрение и полив проводили в оптимальном для фасоли режиме. У каждого растения отмечали дату начала цветения после появления первого цветка, маркировали стебель бумажными этикетками и вычисляли продолжительность периода «всходы – цветение».

Опыт проводили в условиях естественного длинного (17 ч 30 мин – 18 ч 52 мин) и короткого (12 ч) фотопериода. Короткий день (КД) создавали, закатывая вагонетки с сосудах в светонепроницаемый фотопериодический павильон, в котором они находились с 21.00 до 9.00. Длинный день (ДД) обеспечивали, закатывая вагонетки на этот же период времени в стеклянный вегетационный павильон.

Температура воздуха в период вегетации растений за годы исследования приведена на рис. 1.

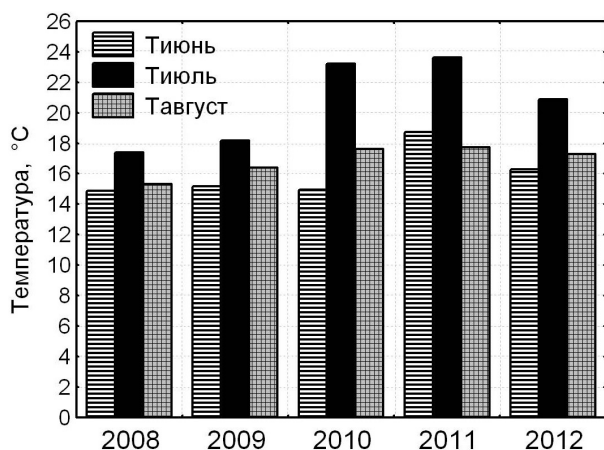


Рис. 1. Средняя суточная температура воздуха периода «всходы – цветение» образцов фасоли в годы исследования

В расчет взяли средние за месяц среднесуточные температуры воздуха, характеристику периодов устойчивого перехода температуры через 10 и 15 °C. Для всех образцов были рассчитаны суммы температур за период «всходы – цветение».

ФПЧ устанавливали по величине задержки цветения на ДД по сравнению с КД ($T_1 - T_2$) и предложенного нами коэффициента ФПЧ ($K_{фпч}$), вычисляемого по формуле ($K_{фпч} = T_1 / T_2$), где T_1 и T_2 – продолжительность периода «всходы – цветение» (сутки) у растений фасоли, выращенных соответственно в условиях длинного естественного и короткого 12-часового дня [Кошкин и др., 1994]. Образцы фасоли, имеющие $K_{фпч} = 1,00-1,10$, классифицировали как слабочувствительные к фотопериоду.

Этим значениям соответствовали образцы, задерживающие цветение на ДД по сравнению с КД в пределах 1–4 сут.

Статистическую обработку данных осуществляли в пакете StatSoft Statistica 6.0. Поскольку распределение исследованных образцов по продолжительности периода «всходы – цветение» на ДД и КД, $K_{фпч}$ и $T_1 - T_2$ имело отличный от нормального вид распределения, исследовались структурные характеристики вариационных рядов: медиана, квартили, минимальное и максимальное значение. Для определения связи между признаками использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Связь с температурами была описана уравнением регрессии. В исследовании принят уровень значимости 5 %.

Результаты и обсуждение

Во все годы исследования всходы фасоли появлялись у всех образцов одновременно на КД и ДД в интервале 3–13 июня. Однако первые бутоны в условиях КД появлялись у большей части образцов раньше, чем на ДД. Лишь несколько образцов российской селекции и один образец из Германии на ДД зацветали раньше, чем на КД.

По продолжительности периода «всходы – цветение» образцы распределились неравномерно в условиях как КД, так и ДД: 75 % образцов на КД зацветали в интервале 29–41 сут, на ДД – 31–45 сут от всходов. При этом на КД цветение образцов начиналось более синхронизированно: в среднем по опыту период «всходы – цветение» длился 22 сут с размахом признака 29–48 сут, на ДД в два раза дольше – 44 дня – в интервале 31–66 сут. Задержка цветения на ДД по сравнению с КД в среднем по опыту составила 4,5 сут (рис. 2).

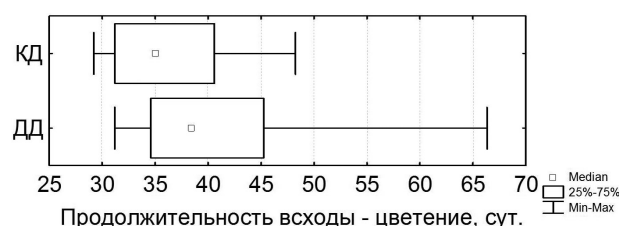


Рис. 2. Продолжительность периода «всходы – цветение» в среднем за 5 лет изучения

Коэффициент ФПЧ варьировал в диапазоне 0,97–2,11. По его значению образцы также распределились с правосторонней асимметрией, что свидетельствует о преобладании в изученном наборе образцов с почти нейтральной реакцией на фотопериод. Значение

коэффициента 0,98–1,10 было отмечено у 57 образцов; 1,11–1,50 – у 38 образцов и выше 1,51 – у трех образцов из изученного набора (рис. 3).

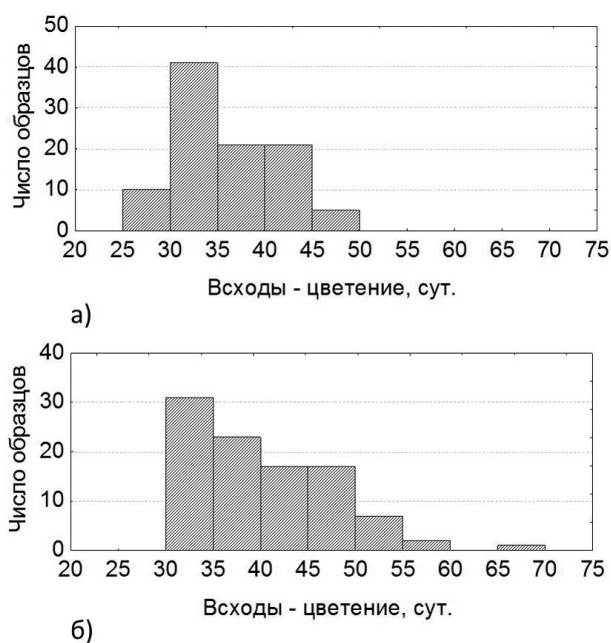


Рис. 3. Распределение изученных образцов фасоли по продолжительности периода «всходы – цветение» (а – в условиях КД, б – в условиях ДД)

Расчет ранговой корреляции признаков T_1 , T_2 и T_1 / T_2 (по Спирмену) показал среднюю силу связи ФПЧ с продолжительностью периода «всходы – цветение» на ДД ($p = 0,45$, значим).

Таблица 1. Матрица коэффициентов ранговой корреляции Спирмена

	T_1	T_2	T_1 / T_2
T_1	1,000	0,777	0,454
T_2	0,777	1,000	-0,110
T_1 / T_2	0,454	-0,110	1,000

Значимая связь наблюдалась у образцов между T_1 и T_2 , что отражает природу образца по отношению ко времени наступления цветения (рано/поздно) как на ДД, так и на КД.

В таблице 2 представлено распределение образцов по значению коэффициента ФПЧ в соответствии с географической принадлежностью. Образцы из высоких северных и южных широт имели преимущественно почти нейтральную реакцию на фотопериод.

В нашем опыте оценка сортов проходила в разные годы, и погодные условия опыта были различны. Поскольку полив сосудов осуществляли вручную в соответствии с биологическим оптимумом для культуры, мы взяли в расчет только температурный фактор.

Наиболее влияющим на продолжительность периода «всходы – цветение» фактором оказалась средняя эффективная температура за период устойчивого перехода температур через $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{эф}15}$), показывающая, насколько температуры превышали $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, и отражающая напряженность температурного фактора года.

Зависимость продолжительности периода «всходы – цветение» на КД можно представить уравнением:

$$T_2 = 48,7 - 3,0T_{\text{эф}15} \quad r = 0,92 \quad (p = 0,027),$$

где r – коэффициент корреляции, p – уровень его значимости.

Несколько меньше, но также положительна корреляция с температурой июля – месяца, когда началось цветение у всех образцов в интервале 3–29 июля на КД и 6 июля – 4 августа на ДД.

$$T_2 = 63,9 - 11,4T_{\text{июль}} \quad r = 0,87 \quad (p = 0,057)$$

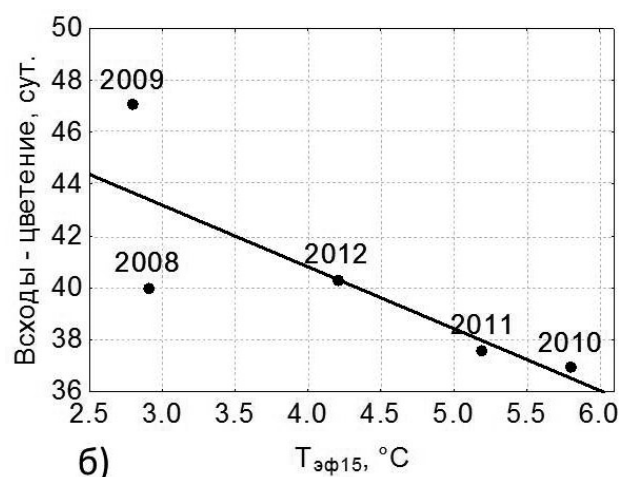
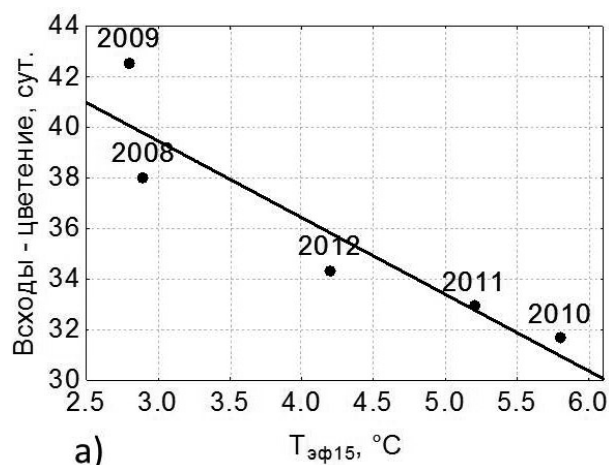


Рис. 4. Зависимость продолжительности периода «всходы – цветение» от средней $T_{\text{эф}15}$ (а – на КД; б – на ДД)

То есть период «всходы – цветение» на КД укорачивался при наиболее высоких значениях эффективных температур. Наиболее высоким

Таблица 2. Значение коэффициента ФПЧ у образцов фасоли разного географического происхождения

№	Происхождение	Число образцов	Среднее	Медиана	Минимум	Максимум
1	Ленинградская обл.	1	1,00	1	1,00	1,00
2	Монголия	1	1,01	1,01	1,01	1,01
3	Венгрия	1	1,01	1,01	1,01	1,01
4	Краснодарский край	4	1,06	1,03	0,97	1,23
5	Болгария	1	1,03	1,03	1,03	1,03
6	Ставропольский край	1	1,04	1,04	1,04	1,04
7	Англия	4	1,05	1,04	1,03	1,10
8	Астраханская обл.	1	1,05	1,05	1,05	1,05
9	Мексика	4	1,06	1,05	1,02	1,12
10	Орловская обл.	3	1,07	1,05	0,99	1,17
11	Венесуэла	1	1,05	1,05	1,05	1,05
12	Италия	1	1,05	1,05	1,05	1,05
13	Германия	3	1,08	1,05	0,98	1,20
14	Австралия	3	1,11	1,06	0,99	1,29
15	Швеция	2	1,07	1,07	1,05	1,08
16	Иркутская обл.	1	1,07	1,07	1,07	1,07
17	Бразилия	5	1,11	1,07	1,04	1,27
18	Китай	3	1,07	1,08	1,06	1,09
19	Турция	1	1,08	1,08	1,08	1,08
20	Московская обл.	6	1,16	1,08	0,98	1,67
21	Польша	2	1,08	1,08	1,03	1,13
22	Украина	1	1,08	1,08	1,08	1,08
23	Омская область	1	1,08	1,08	1,08	1,08
24	Дальний Восток	1	1,08	1,08	1,08	1,08
25	Саратовская область	1	1,11	1,11	1,11	1,11
26	Нидерланды	3	1,09	1,12	1,03	1,13
27	Алтай	1	1,12	1,12	1,12	1,12
28	Норвегия	3	1,22	1,12	1,02	1,52
29	Бутан	2	1,13	1,13	1,07	1,20
30	Франция	7	1,29	1,14	1,07	2,11
31	США	10	1,12	1,14	1,01	1,22
32	Литва	1	1,15	1,15	1,15	1,15
33	Азербайджан	1	1,17	1,17	1,17	1,17
34	Канада	5	1,17	1,19	1,06	1,27
35	Чили	4	1,22	1,19	1,05	1,43
36	Непал	1	1,20	1,20	1,20	1,20
37	Япония	1	1,20	1,20	1,20	1,20
38	Танзания	5	1,19	1,26	1,00	1,40
39	Грузия	1	1,49	1,49	1,49	1,49

этот показатель был в 2010 г., и все изученные образцы на КД показали минимальное число дней от всходов до цветения – 31,6 (рис. 4, а; 5, а). В сравнительно прохладном 2009 г. средняя продолжительность периода «всходы – цветение» на КД составила 42 сут, то есть на 10,4 сут больше (рис. 4, а; 5, а). Аналогичная закономерность с меньшим уровнем значимости ($T_1 = 50,33 - 2,38T_{эф15}$, $r = 0,80$ ($p = 0,105$)) выявилась на ДД: в сравнительно теплом 2010 г. период «всходы – цветение» составил 36,9 сут., в прохладном 2009 г. – 47,4 сут; почти с такой же разницей, что и на КД, – на 10,5 сут больше (рис. 4, б; 5, б). При этом варьирование продолжительности этого периода было гораздо больше на ДД, чем на КД.

Следует отметить также, что в прохладные годы как на КД, так и на ДД наступление фазы «цветение» было более синхронизировано у всех изученных образцов.

Выявилась связь $K_{ФПЧ}$ с температурами: $T_{эф15}$ $r = 0,76$ ($p = 0,134$), $T_{июль}$ $r = 0,79$ ($p = 0,109$). Это значит, что чем выше была температура, тем при более раннем по сравнению с прохладными годами наступлении периода «всходы – цветение» он дольше затягивался на ДД, то есть задержка $T_1 - T_2$ в теплые годы была больше. Соответственно, это приводило к увеличению $K_{ФПЧ}$.

Для наступления фазы «цветение» растениям на КД потребовалось 627 °С, в то время как на ДД – 723 °С, то есть в среднем на 96 °С больше. Для образцов, не чувствительных к фотопериоду ($K_{ФПЧ} = 0,9 - 1,1$), эта сумма была значительно ниже – 652 °С, с диапазоном варьирования 544–893 °С.

Реакция на фотопериод – одно из основных биологических качеств растений, определяющих разные аспекты его жизни, и прежде всего, переход из вегетативной к генеративной стадии развития. Этот переход определяется

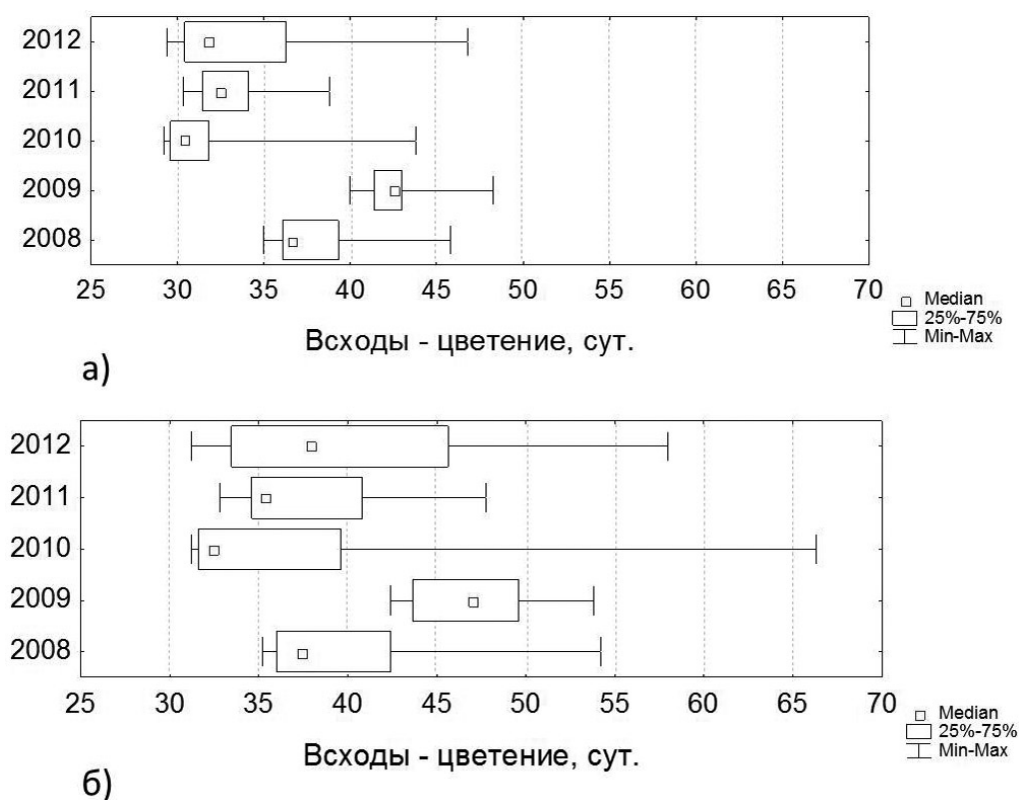


Рис. 5. Продолжительность периода «всходы – цветение» по годам изучения (а – на КД, б – на ДД)

началом фенофазы «цветение». Реакция фасоли на фотопериод имеет сложную генетическую природу, определяющую комплекс физиологических и биохимических процессов, лежащих в основе этого явления. Генетический контроль фотопериодической чувствительности у фасоли контролируется двумя генами: *PPD* и *Hr*. D. H. Wallace с коллегами [1993] нашли, что рецессивный ген *ppd* определяет нечувствительность растения к длине дня, предположив, что это тот же ранее найденный ген *neu* [Rudorf, 1958]. Ген *Hr* усиливает эффект гена фотопериода [Kornegay et al., 1993], поэтому его символ предлагали заменить на *Enh* (enhancer) [White, Kornegay, 1994]. Выявлены множественный аллелизм и эпистатические эффекты этих генов [Kornegay et al., 1993].

Изучив реакцию 98 образцов фасоли на фотопериод в условиях Северо-Запада РФ, мы выявили, что на коротком дне цветение образцов наступает раньше и период «всходы – цветение» менее растянут по времени, чем на ДД. Выявленная слабая связь между ФПЧ образцов и продолжительностью этого периода на ДД (0,454) свидетельствует о наличии реакции генотипов на длину дня – задержке экспрессии генов, определяющих индукцию цветения.

Выявлено, что большая часть образцов изученной выборки обладали слабой ФПЧ и всего три образца имели сильную степень проявления данного признака. Этот факт отражает адаптацию фасоли к длинному дню. В литературе не однажды встречались утверждения о том, что фасоль можно считать растением со средней ФПЧ. В частности, одни из первых исследователей фотопериода у фасоли Н. Allard и W. Zaumeyer [1944] пришли к заключению, что «виды *P. vulgaris* и *P. lunatus* обладают нейтральной реакцией на длину дня, однако в генофонде имеются образцы, не зацветающие на длинном дне».

В одном из исследований нескольких тысяч сортов фасоли показано, что образцы из высоких широт, как северных, так и южных, обладают меньшей ФПЧ [Massaya, White, 1991]. В нашем исследовании ранжирование $K_{ФПЧ}$ в зависимости от происхождения образцов практически соответствовало этому положению. Все образцы, обладавшие минимальной ФПЧ ($K_{ФПЧ} = 1,00–1,058$), происходили из регионов, расположенных выше 45° с. ш. (см. табл. 1). Это, по-видимому, следствие селекции данных образцов в условиях длинного дня. Однако в ранг слабочувствительных попали и сорта из Мексики и Венесуэлы – стран, расположенных в тропической

зоне. Все образцы из США попали в группу среднечувствительных, обладающих $K_{фпч}$, близким к значению, характерному для образцов со слабой ФПЧ.

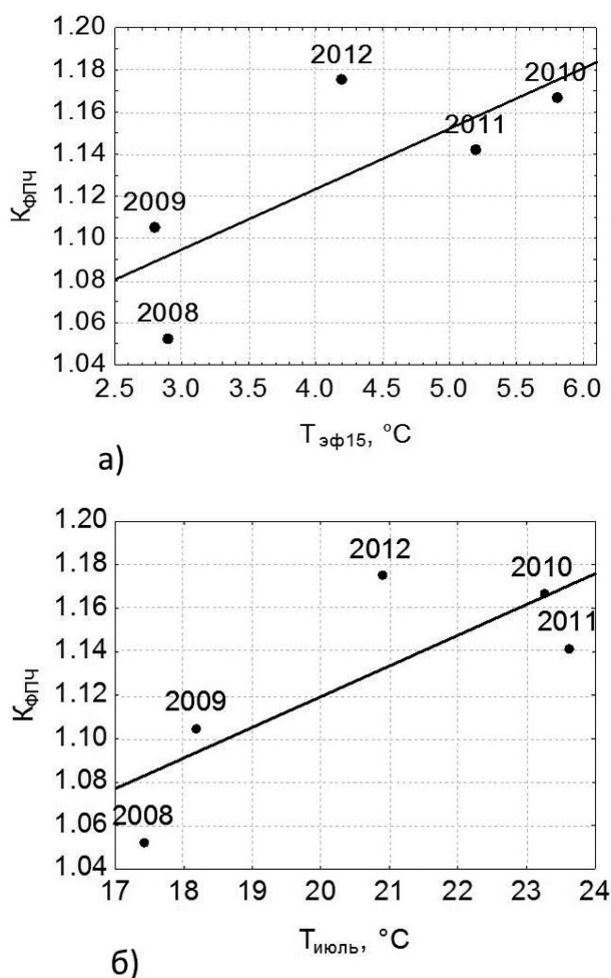


Рис. 6. Зависимость $K_{фпч}$ от температуры воздуха (а – от суммы $T_{эф15}$; б – от суммы активных температур июля)

Обсуждая зависимость ФПЧ от географического происхождения образца, необходимо учитывать несколько обстоятельств. Во-первых, в нашем опыте нужно учесть статистическую погрешность, поскольку представленность образцов из разных стран и с разных географических широт была различной. Во-вторых, одна из тенденций современной селекции фасоли – создание скороспелых сортов даже в странах с теплым климатом и коротким днем. Скороспелость позволяет сортам созреть до засухи, которая типична для южных стран в период налива семян и созревания и пагубно отражается на продуктивности. Поэтому интрогрессия в современные сорта аллелей слабой чувствительности к фотопериоду актуальна и в странах, расположенных в низких южных и северных широтах. И, в-третьих,

наряду с географическим происхождением сорта необходимо учитывать его экологическую приуроченность. Так, горные условия, которые характерны для упомянутых нами Мексики и Венесуэлы, характеризуются пониженными температурами. Известно, что при пониженных температурах длиннодневные растения могут успешно произрастать в условиях более короткого дня. Этим объясняется преобладание длиннодневных видов в горных областях близ экватора. Есть предположение, что горные системы меридионального направления могут служить своеобразными «мостами», по которым возможна миграция длиннодневных форм из северных районов в более южные [Горышина, 1979].

Для фасоли, как и для многих других видов растений, известна зависимость фотопериодической чувствительности от температуры воздуха [Coayne, 1966, 1970, 1978; Murfet, 1977; Wallace, Enriquez, 1980]. Показано, что при различных сочетаниях длины фотопериода и температуры воздуха ФПЧ растений меняется. Были попытки понять характер наследования признака ФПЧ в сочетании с температурой, и найдены гены-модификаторы [Massaya, 1978. Цит. по Bassett, 1996]. Позднее идентифицировали ген *Tip* (temperature insensivity of photoperiod response) [White et al., 1996]. Однако все исследователи признают сложность этого многофакторного феномена – начала цветения растений, зависящего от генотипа и его реакции на длину дня и сопутствующую ей температуру, которая может быть выше или ниже оптимума. В частности, показано, что с повышением температуры воздуха от 15 до 23–24 $^\circ C$ период «всходы – цветение» на ДД у фасоли укорачивался как у слабочувствительных, так и у чувствительных генотипов. С превышением температурой оптимума для начала цветения этот период затягивался у сильночувствительных генотипов [Wallace, Enriquez, 1980; Wallace et al., 1991].

Наиболее важной для нас закономерностью следует считать тот факт, что в экваториальных широтах в условиях КД и пониженных температур разные генотипы зацветали в обычные для них сроки, в то время как на ДД и высоких температурах они сильно (до 100 дней) задерживали цветение [White et al., 1996]. Аналогичные данные получены в работе Р. N. Massaya и J. W. White [1991], показавших, что с повышением температур на ДД сильночувствительные генотипы задерживают цветение в прямой зависимости от длины дня и температуры. Это свидетельствует о том, что переход растений в репродуктивную фазу в данных условиях опыта модулируется субоптимальной температурой, но больше зависит от фотопериода.

В нашем опыте мы наблюдали обратную зависимость. В годы с большей суммой активных температур индукция цветения происходила раньше как на КД, так и на ДД. Так, в самые теплые 2010 и 2011 годы цветение на ДД начиналось в среднем через 36–37 сут после всходов, в самый холодный 2009 г. – через 47 сут. Теплообеспечение – один из важнейших факторов роста и развития растений. Из агроклиматологии известно, что с продвижением к северу растения короткого дня требуют большей суммы температур для развития [Мищенко, 2009]. В более теплые годы на неблагоприятном для культуры ДД начало цветения осуществлялось при определенном фотопериоде и определенной накопленной сумме эффективных температур. В более холодные годы на том же фотопериоде растения не зацветали, поскольку не была накоплена необходимая им сумма эффективных температур. Следовательно, задержка инициации цветения в нашем опыте почти на 11 сут в сравнительно холодный год свидетельствует о том, что температурный фактор играет в данном случае более важную роль для слабочувствительных форм, чем фотопериод. Аналогичное заключение было сделано ранее и для продолжительности всего вегетационного периода фасоли. При выращивании скороспелого сорта Щедрая в градиенте широт от Санкт-Петербурга (Ленинграда) до Майкопа обнаружили прямую зависимость продолжительности его вегетации от температуры воздуха, несмотря на различную длину дня [Иванов, 1961].

Мы выявили, что в годы с более высокими температурами разность между периодом «всходы – цветение» на ДД и КД ($T_1 - T_2$) была большей, чем в прохладные годы. Это определяет изменение ФПЧ. В сравнительно теплые 2010–2012 годы $K_{\text{ФПЧ}}$ у изученных образцов был выше – 1,16–1,18, чем в годы с меньшими суммами активных температур: 2008 и 2009 – 1,05 и 1,11.

Образцы со слабой ФПЧ в нашем опыте требовали и меньшей суммы температур для индукции цветения – в среднем на 71 °С. Аналогичные данные получены в работе J. W. White и J. Kornegay [1994], показавших, что с увеличением температуры ФПЧ фасоли увеличивается, а с понижением температуры уменьшается. Этот феномен объясняют физиолого-биохимическими механизмами, индуцирующими цветение у фасоли. Показано, что в бутонах на ДД накапливается большое количество абсцизовой кислоты, оказывающей ингибирующее действие на инициацию цветения. Этот процесс подвержен влиянию как фотопериода, так и температуры воздуха [Bentley et al., 1975; Morgan, 1977].

Можно предположить, что в сравнительно теплые 2010–2012 годы среднесуточные температуры июля 20,9–23,2 °С и, соответственно, сумма накопленных эффективных температур воздуха оптимальны для индукции цветения фасоли. И именно в оптимальном для нее температурном режиме, являющемся нормой реакции, культуре необходим благоприятный для нее фотопериод, каковому более соответствует КД. Поэтому в теплые годы растения фасоли более требовательны к длине дня, чем в годы с более низкими температурами воздуха.

Следует заметить, что наши выводы о влиянии погодных условий на продолжительность периода «всходы – цветение», полученные за пять лет исследований, мы считаем предварительными и требующими более длительного срока изучения.

В настоящем исследовании не выявлено непосредственной связи слабой ФПЧ с ранним цветением, которое очень часто является индикатором скороспелости образцов. Для фасоли, в частности, показано, что этот период объясняет 80 % варьирования продуктивности биомассы растений, в то время как весь период «всходы – созревание» – только 25 % [Scully, Wallace, 1990]. Кроме того, большую часть материала в нашем исследовании составили кустовые формы, у которых период «цветение – созревание» почти равен периоду «всходы – цветение» [Иванов, 1961], и поэтому по его продолжительности можно судить о продолжительности всего вегетационного периода.

Выводы

1. Изученная выборка из коллекции фасоли ВИР выявила дифференциацию генофонда по отношению к фотопериоду на слабо-, средне- и сильночувствительные образцы с преобладанием первых.

2. На длинном, неблагоприятном для фасоли дне только единичные образцы переходят к цветению в те же сроки, что на коротком. Это преимущественно образцы, созданные в регионах с ДД. Большинство образцов затягивает цветение на ДД по сравнению с КД.

3. Переход растений фасоли в репродуктивную фазу в условиях Северо-Запада РФ зависит и от фотопериода, и от температуры воздуха. Температурный фактор, наиболее влияющий на продолжительность периода «всходы – созревание», – средняя эффективная температура воздуха за период устойчивого перехода температур через 15 °С ($T_{\text{эф15}}$). Для начала цве-

тения на КД потребовалось 627 °С, в то время как на ДД – 723 °С, то есть на 96 °С больше, чем на КД. Для образцов, не чувствительных к фотопериоду ($K_{фпч} = 0,9-1,1$), эта сумма была значительно ниже – 652 °С.

4. Значительная задержка цветения в годы с меньшими суммами эффективных температур по сравнению с более теплыми годами свидетельствует о решающем значении для индукции цветения температурного фактора.

Литература

- Алексеева Е. Н., Буданова В. И. Определение холодоустойчивости фасоли способом проращивания семян при пониженной температуре // Метод. указания. Л.: ВИР, 1985. 14 с.
- Алексеева Е. Н., Петрова М. В. Холодостойкость фасоли на ранних этапах развития // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. 1997. Т. 152. С. 108–111.
- Горышина Т. К. Экология растений. М.: Высш. школа, 1979. 368 с.
- Дорошенко А. В., Разумов В. И. Фотопериодизм некоторых культурных форм в связи с их географическим происхождением // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1929. Т. 22, вып. 1. С. 219–276.
- Иванов Н. Р. Фасоль. Л.; М.: Гос. изд-во с.-х. лит-ры. 1961. 280 с.
- Кошкин В. А., Кошкина А. А., Матвиенко И. И., Прядехина А. К. Использование исходных форм яровой пшеницы со слабой фотопериодической чувствительностью для создания скороспелых продуктивных линий // Доклады РАСХН. 1994. № 2. С. 8–10.
- Мищенко З. А. Агрометеорология: учебник. Киев: КНТ. 2009. 512 с.
- Allard H. A., Zaumeyer W. J. Responses of beans (*Phaseolus*) and other legumes to length of day // U. S. Dep. Agric. Tech. Bull. 1944. Vol. 867. P. 1–14.
- Bassett M. J. List of genes – *Phaseolus vulgaris* L. // Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. 1996. Vol. 39. P. 1–19.
- Beebe S., Toro O., Gonzalez A., Chacyn M., Debouck D. Wild-weed-crop complexes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) in the Andes of Peru and Colombia, and their implications for conservation and breeding // Genet. Res. Crop E. Vol. 1997. Vol. 44. P. 73–91.
- Bentley B., Morgan C. B., Morgan D. G., Saad F. A. Plant growth substances and effects of photoperiod on flower bud development in *Phaseolus vulgaris* // Nature Lond. 1975. М. 256. P. 121–122.
- Coyne D. P. The genetics of photoperiodism and the effect of temperature on the photoperiodic response for time of flowering in beans // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1966. Vol. 89. P. 350–360.
- Coyne D. P. Genetic control of a photoperiod-temperature response for time of flowering in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) // Crop Sci. 1970. Vol. 10, N 3. P. 246–248.
- Coyne D. P. Genetics of flowering in dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1978. Vol. 103, N 5. P. 606–608.
- Gepts P. Origin and evolution of common bean: Past events and recent trends. Hort. Science. 1998. Vol. 33. P. 1124–1130.
- Gepts P. Crop Domestication as a Long-term Selection Experiment // Plant Breeding Reviews. 2004. Vol. 24. Part 2. P. 1–44.
- Koinange E. M. K., Singh S. P., Gepts P. Genetic control of the domestication syndrome in common bean // Crop Science. 1996. Vol. 36. P. 1037–1045.
- Kornegay J., White J. W., Dominguez J. R., Tejado G., Cajiao C. Inheritance of photoperiod response in Andean and Mesoamerican common bean. Crop Science. 1993. Vol. 33. P. 977–984.
- Massaya P. Genetic and environmental control of flowering in *Phaseolus vulgaris* L. // Ph. D. Thesis. Cornell Uni. Vol. 1978.
- Massaya P. N., White J. W. Adaptation to photoperiod and temperature // Common Bean: research for crop improvement. / Eds. A. van Schoonhoven, O. Voysest. Wallingford: UK. 1991. P. 445–500.
- Morgan D. G. Plant growth substances and flower development. Pesticide Science. 1977. Vol. 8. P. 230–235.
- Murfet I. C. Environmental interaction and the genetics of flowering // Annu. Revol. Plant Physiol. 1977. Vol. 28. P. 253–278.
- Norton J. B. Inheritance of habit in the common bean // Am. Nat. 1915. Vol. 49. P. 547–561.
- Rudolf W. Genetics of *Phaseolus aborigineus* Burkart // Proc. X Intern. Cong. Genet. 1958. Vol. 2. P. 243.
- Scully B. T., Wallace D. H. Variation in and Relationship of Biomass, Growth Rate, Harvest Index and Phenology to Yield of Common Bean // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1990. Vol. 115, N 2. P. 218–225.
- Wallace D. H., Enriquez G. A. Daylength and temperature effects on days to flowering of early and late maturing beans (*Phaseolus vulgaris* L.) // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1980. Vol. 105. P. 583–591.
- Wallace D. H., Gniffke P. A., Masaya P. N., Zobel R. W. Photoperiod, temperature, and genotype interaction effects on days and nodes required for flowering of bean // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1991. Vol. 116, N 3. P. 534–543.
- Wallace D. H., Yourstone K. S., Masaya P. N., Ubel R. W. Photoperiod control over partitioning between reproductive and vegetative growth // Theor. Appl. Genet. 1993. Vol. 86. P. 6–16.
- White J. W., Kornegay J. Response of common bean to photoperiod and temperature – a micro review // Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. Bean Improvement Cooperative. 1994. Vol. 37. P. 44–45.
- White J. W., Kornegay J., Cajiao C. Inheritance of temperature sensitivity of the photoperiod response in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // Euphytica. 1996. Vol. 91. Issue 1. P. 5–8.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Вишнякова Маргарита Афанасьевна

зав. отделом, д. б. н.
Всероссийский научно-исследовательский институт
растениеводства им. Н. И. Вавилова РАСХН
ул. Большая Морская, 42, Санкт-Петербург,
Россия, 190000
эл. почта: m.vishnyakova@vir.nw.ru
тел.: (812) 3144732

Кошкин Владимир Александрович

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Всероссийский научно-исследовательский институт
растениеводства им. Н. И. Вавилова РАСХН
Московское шоссе, 11, Пушкин,
Россия, 196601
эл. почта: koshkin-va@mail.ru
тел.: (812) 4518256

Егорова Галина Павловна

научный сотрудник
Всероссийский научно-исследовательский институт
растениеводства им. Н. И. Вавилова РАСХН
ул. Большая Морская, 42, Санкт-Петербург,
Россия, 190000
эл. почта: g.egorova@vir.nw.ru
тел.: (812) 3144732

Новикова Любовь Юрьевна

зав. отделом, к. т. н.
Всероссийский научно-исследовательский институт
растениеводства им. Н. И. Вавилова РАСХН
ул. Большая Морская, 42, Санкт-Петербург,
Россия, 190000
эл. почта: l.novikova@vir.nw.ru
тел.: (812) 3144727

Матвиенко Инна Ивановна

научный сотрудник
Всероссийский научно-исследовательский институт
растениеводства им. Н. И. Вавилова РАСХН
Московское шоссе, 11, Пушкин,
Россия, 196601
тел.: (812) 4518256

Vishnyakova, Margarita

N. I. Vavilov Research Institute of Plant Industry,
42 Bolshaya Morskaya St., 190000 St. Petersburg,
Russia
e-mail: m.vishnyakova@vir.nw.ru
tel.: (812) 3144732

Koshkin, Vladimir

N. I. Vavilov Research Institute of Plant Industry,
11 Moskovskoe highway, 196601 Puskin,
Russia
e-mail: koshkin-va@mail.ru
tel.: (812) 4518256

Egorova, Galina

N. I. Vavilov Research Institute of Plant Industry,
42 Bolshaya Morskaya St., 190000 St. Petersburg,
Russia
e-mail: g.egorova@vir.nw.ru
tel.: (812) 3144732

Novikova, Lyubov

N. I. Vavilov Research Institute of Plant Industry,
42 Bolshaya Morskaya St., 190000 St. Petersburg,
Russia
e-mail: l.novikova@vir.nw.ru
tel.: (812) 3144727

Matvienko, Inna

N. I. Vavilov Research Institute of Plant Industry,
11 Moskovskoe highway, 196601 Puskin, Russia
tel.: (812) 4518256

УДК 581.1

РЕАКЦИЯ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) НА РАЗДЕЛЬНОЕ И СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И КАДМИЯ

Н. С. Репкина, В. В. Таланова, А. Ф. Титов, И. В. Букарева

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучена реакция растений пшеницы на действие пониженных температур, сульфата кадмия и на их совместное действие. Установлено, что чем ниже действующая на растения температура (4–12 °C) и выше концентрация сульфата кадмия (100–2000 мкМ), тем более выражено их негативное влияние на ростовые процессы. Совместное действие температуры 4 °C и сульфата кадмия (100 мкМ) в начальный период действия (1–3 сут) не приводит к усилению торможения роста побега по сравнению с действием только низкой температуры, тогда как при более продолжительном действии происходит частичное суммирование их негативных эффектов. При этом как раздельное, так и совместное действие двух факторов не вызывает полной остановки роста побега и значительных изменений выхода электролитов из клеток листа, что свидетельствует об активации механизмов адаптации растений к действию указанных неблагоприятных факторов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: низкая температура, кадмий, рост, проницаемость мембран.

**N. S. Repkina, V. V. Talanova, A. F. Titov, I. V. Bukareva. WHEAT
RESPONSE TO SEPARATE AND COMBINED IMPACT OF LOW
TEMPERATURE AND CADMIUM**

In the present study, the response of wheat to the effect of low temperature, cadmium sulphate and their combined effect was investigated. The results showed that the lower the temperature wheat is exposed to (4–12 °C) and the higher the concentration of cadmium sulphate (100–2000 µM), the more negative their effect on growth processes is. In the first period (1–3 days) a combined influence of low temperature (4 °C) and cadmium sulphate (100 µM) did not lead to a greater inhibition of the seedling growth in comparison with the low temperature impact alone, whereas a longer combined influence of low temperature and cadmium sulphate caused partial summation of their negative effects. Neither separate nor combined effects of the two environmental factors led to a full stop of the seedlings growth or to significant changes in electrolyte leakage from leaf cells. Together, the above results clearly indicate an activation of adaptation to the influence of the studied stress factors.

K e y w o r d s: low temperature, cadmium, growth, permeability of cell membranes.

Введение

В природных условиях одним из главных факторов внешней среды, лимитирующих рост, развитие и продуктивность растений, является температура и ее флуктуации [Дроздов и др., 1984; Коровин, 1984; Xin, Browse, 2000; Sung et al., 2003; Войников, 2013]. В целом диапазон температур, пригодных для жизни растений суши, достаточно широк (около 60 °C), однако адаптационный потенциал многих видов весьма ограничен, а некоторые из них практически не могут приспосабливаться к неблагоприятным температурам [Лархер, 1978]. В последние десятилетия в связи с активным развитием промышленности и автотранспорта к отрицательным факторам добавляется воздействие на растения различных загрязнителей, в частности тяжелых металлов, среди которых одним из наиболее токсичных является кадмий [Титов и др., 2007]. Этот элемент негативно влияет на все основные физиологические и биохимические процессы растений [Титов и др., 2007; Башмаков, Лукаткин, 2009; Gallego et al., 2012]. Кроме того, кадмий и его соединения, попадая в окружающую среду и поглощаясь растениями, по цепи питания могут поступать в организм животных и человека, оказывая токсическое действие [Казнина, Титов, 2013].

Необходимо отметить, что обычно исследователи изучают реакцию растений на действие одного конкретного неблагоприятного фактора, а работы, посвященные изучению комбинированного (совместного или последовательного) действия факторов разной природы, пока единичны [Гармаш, Головкин, 2009; Hu et al., 2010; Iqbal, Ashraf, 2010; Grigorova et al., 2011]. В природных же условиях неблагоприятные факторы зачастую действуют на растения одновременно, а ответная реакция на совместное действие факторов может заметно отличаться от реакции на действие одного из них.

Учитывая вышеизложенное, цель данного исследования заключалась в изучении реакции растений пшеницы на раздельное и совместное действие низкой температуры и ионов кадмия.

Материалы и методы

Исследования проведены с использованием приборно-аналитической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

В качестве объекта исследований использовали проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39. Растения выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на

питательном растворе (pH 6,2–6,4) с добавлением микроэлементов в климатических камерах при температуре воздуха 22 °C, его относительной влажности 60–70 %, освещенности около 10 клк и 14-часовом фотопериоде. По достижении недельного возраста проростки пшеницы в течение 7 сут подвергали действию низких закалывающих температур (4, 8, 12 °C) или кадмия в форме сульфата (100–2000 мкМ), сохраняя прочие условия неизменными. В специальном опыте проростки пшеницы подвергали воздействию температуры 4 °C, сульфата кадмия в концентрации 100 мкМ, а также их совместному действию.

Биометрические показатели (высота растений и длина 1-го листа) анализировали общепринятым методом.

Проницаемость мембран клеток определяли кондуктометрически по выходу электролитов из высечек листьев пшеницы с использованием кондуктометра («HANNA», Италия) [Грищенко, Лукаткин, 2005].

Результаты

Изучение динамики биометрических показателей растений пшеницы при действии температур 4, 8 и 12 °C показало, что чем ниже температура, тем в большей степени замедляются ростовые процессы (табл. 1). Так, при температуре 4 °C уже в начальный период ее действия (1 сут) происходило практически полное прекращение роста побега пшеницы, и несмотря на то, что через 2–3 сут начиналось частичное его восстановление, даже к концу эксперимента (на 7-е сут) высота побега превышала исходный уровень всего на 20 % (в контроле – на 70 %). При температурах 8 и 12 °C также наблюдалось торможение роста побега, хотя и в меньшей степени, чем при 4 °C (прирост за 7 сут составил 25 и 35 % соответственно).

Аналогичный эффект температур 4, 8 и 12 °C отмечен и в отношении роста 1-го листа пшеницы (см. табл. 1).

Таким образом, чем ниже действующая на растения температура, тем более выражено ее негативное влияние на ростовые процессы. Вместе с тем, полученные результаты показали, что хотя температуры 4, 8 и 12 °C и вызывают торможение роста пшеницы, полной его остановки не происходит. Это говорит о способности растений пшеницы поддерживать на определенном уровне основные процессы жизнедеятельности в условиях пониженных температур. Наблюдаемое при этом торможение роста можно рассматривать как защитно-приспособительную реакцию растений, поскольку известно, что у них в условиях действия пониженных темпера-

тур происходит перестройка метаболизма и энергетического обмена в сторону усиления синтеза резервных, энергоемких и протекторных соединений, например, углеводов, необходимых растению для увеличения устойчивости к холоду [Чиркова, 2002; Трунова, 2007; Климов, 2009; Wenifield et al., 2010]. Очевидно, одним из результатов такого рода изменений, наряду с увеличением холодоустойчивости, является преобладание донорной функции (фотосинтеза) над акцепторной (рост) [Трунова, 2007; Климов и др., 2008].

Таблица 1. Влияние пониженных температур на рост растений пшеницы

Экспозиция, сут	Вариант			
	контроль	12 °C	8 °C	4 °C
Высота растений, см				
исходный уровень	17,5 ± 0,1	18,3 ± 0,2	17,8 ± 0,3	15,5 ± 0,3
1	19,8 ± 0,2	19,8 ± 0,2	18,4 ± 0,3	15,9 ± 0,3
2	22,2 ± 0,1	21,2 ± 0,2	19,2 ± 0,3	16,3 ± 0,3
3	23,3 ± 0,1	22,5 ± 0,2	19,9 ± 0,3	16,8 ± 0,3
6	27,9 ± 0,3	24,3 ± 0,2	21,6 ± 0,3	17,8 ± 0,3
7	30,0 ± 0,3	24,7 ± 0,2	22,2 ± 0,3	18,5 ± 0,3
Длина 1-го листа, см				
исходный уровень	13,6 ± 0,2	14,9 ± 0,2	14,0 ± 0,3	12,0 ± 0,3
1	16,1 ± 0,2	16,1 ± 0,2	14,7 ± 0,3	12,3 ± 0,3
2	18,7 ± 0,1	17,5 ± 0,2	15,4 ± 0,3	12,8 ± 0,3
3	19,7 ± 0,1	18,8 ± 0,2	16,1 ± 0,3	13,2 ± 0,3
6	20,0 ± 0,1	20,5 ± 0,2	17,8 ± 0,3	14,3 ± 0,3
7	20,1 ± 0,1	20,6 ± 0,2	18,3 ± 0,3	14,8 ± 0,3

Как известно, торможение роста представляет собой общее проявление ответной реакции растений на действие многих стресс-факторов, включая тяжелые металлы [Гуральчук, 1994; Vassilev, Iordanov, 1997; Чиркова, 2002; Титов и др., 2007 и др.]. Причем существует достаточно хорошо выраженная дозовая зависимость между концентрацией тяжелого металла и продолжительностью его воздействия, с одной стороны, и степенью ингибирования роста – с другой [Алексеева-Попова, 1991; Титов и др., 1995].

Нами проведено изучение действия сульфата кадмия в диапазоне концентраций от 100 до 2000 мкМ на ростовые показатели растений пшеницы. Установлено, что под влиянием ионов кадмия прирост побега растений за 7 сут уменьшался, составляя в зависимости от его концентрации 32 % и менее (табл. 2), в то время как в контрольном варианте он достигал, как уже отмечалось, примерно 70 %. Аналогичное действие кадмий оказывал и на размеры 1-го листа. В частности, если в контроле длина 1-го листа увеличилась за 7 сут на 50 %, то при действии сульфата кадмия в концентрациях 100, 200, 500, 700, 1000 и 2000 мкМ – на 45, 40, 26, 25, 16 и 12 % соответственно (см. табл. 2). Отметим, что торможение роста растений пшеницы проявлялось уже через 1 сут от начала действия кадмия, и с увеличением экспозиции этот процесс усиливался (см. табл. 2).

Из полученных результатов следует, что сульфат кадмия в концентрациях 100–700 мкМ тормозит рост пшеницы, но не подавляет его полностью, т. е. повреждения растений в данном случае не происходит. В отличие от этого под влиянием сульфата кадмия в концентрациях 1000 и 2000 мкМ отмечено резкое торможение и даже полная остановка роста, что может свидетельствовать о повреждающем эффекте указанных концентраций на растения.

Эти данные хорошо согласуются с результатами изучения проницаемости мембран клеток листа пшеницы. В частности, сульфат кадмия в концентрациях 1000 и 2000 мкМ в течение 7 сут вызывал значительное увеличение выхода электролитов из тканей листа, указывающее на нарушение проницаемости мембран и повреждение растений, в то время как концентрации сульфата кадмия 100–500 мкМ не вызвали существенных изменений в проницаемости мембран (рис. 1).

В дальнейшем нами было изучено влияние совместного действия низкой температуры

Таблица 2. Влияние сульфата кадмия на рост растений пшеницы

Экспозиция, сут	Концентрация сульфата кадмия, мкМ					
	контроль	100	200	500	1000	2000
Высота растений, см						
исходный уровень	16,6 ± 0,2	16,4 ± 0,3	16,5 ± 0,3	16,5 ± 0,1	15,4 ± 0,4	16,3 ± 0,2
1	19,5 ± 0,2	18,3 ± 0,7	18,4 ± 0,3	17,4 ± 0,4	16,7 ± 0,4	16,6 ± 0,1
2	22,0 ± 0,2	20,7 ± 0,4	19,9 ± 0,3	18,3 ± 0,4	17,6 ± 0,3	17,5 ± 0,3
3	22,9 ± 0,1	21,5 ± 0,5	20,7 ± 0,3	18,9 ± 0,4	18,2 ± 0,3	18,2 ± 0,3
6	26,5 ± 0,2	22,0 ± 0,3	21,6 ± 0,2	19,3 ± 0,2	18,6 ± 0,3	18,6 ± 0,3
7	28,3 ± 0,2	22,2 ± 0,3	21,8 ± 0,1	19,5 ± 0,2	18,7 ± 0,3	18,6 ± 0,3
Длина 1-го листа, см						
исходный уровень	13,4 ± 0,2	12,9 ± 0,3	12,9 ± 0,2	12,7 ± 0,3	12,2 ± 0,4	13,0 ± 0,3
1	15,9 ± 0,2	15,2 ± 0,3	14,9 ± 0,2	14,0 ± 0,3	13,3 ± 0,4	13,4 ± 0,1
2	18,0 ± 0,2	17,0 ± 0,3	16,3 ± 0,3	14,9 ± 0,3	14,3 ± 0,4	14,0 ± 0,1
3	18,7 ± 0,2	17,8 ± 0,4	17,1 ± 0,3	15,5 ± 0,3	14,8 ± 0,3	14,7 ± 0,1
6	19,3 ± 0,3	18,5 ± 0,3	17,9 ± 0,1	15,9 ± 0,2	15,3 ± 0,3	15,1 ± 0,9
7	20,1 ± 0,2	18,7 ± 0,3	18,1 ± 0,1	16,0 ± 0,2	15,3 ± 0,3	15,1 ± 0,9

и кадмия на растения пшеницы. В опытах использованы температура 4 °C и сульфат кадмия в концентрации 100 мкМ, при которых наблюдалось заметное замедление роста, но его остановка и повреждение растений не происходили.

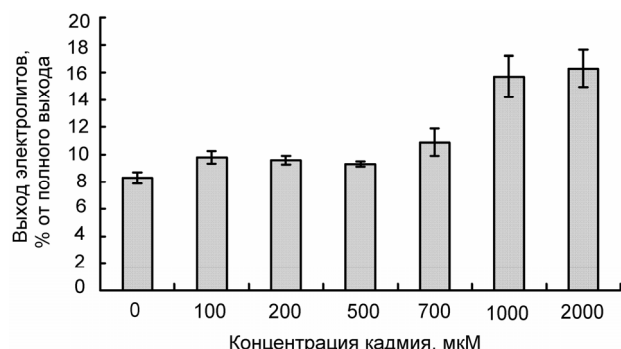


Рис. 1. Зависимость выхода электролитов из листьев пшеницы от концентрации сульфата кадмия. Продолжительность действия сульфата кадмия – 7 сут

Опыты показали, что непродолжительное (1–3 сут) совместное действие этих факторов не приводит к усилению торможения роста побега по сравнению с действием только низкой температуры. В отличие от этого более продолжительное совместное действие температуры 4 °C и кадмия вызывало большее замедление роста, чем их раздельное действие. Так, за 7 сут высота растений увеличилась в этом случае лишь на 12 % по сравнению с исходным уровнем (табл. 3), что свидетельствует о частичном суммировании негативных эффектов этих факторов на ростовые процессы. Но так же, как при их раздельном воздействии, полной остановки роста не происходило.

Таблица 3. Раздельное и совместное влияние температуры 4 °C и сульфата кадмия (100 мкМ) на высоту растений пшеницы

Экспозиция, сут	Показатель			
	контроль	4 °C	Cd	4 °C + Cd
Высота растений, см				
исходный уровень	16,0 ± 0,1	15,5 ± 0,3	16,7 ± 0,2	17,0 ± 0,2
1	19,1 ± 0,1	15,9 ± 0,3	18,5 ± 0,2	17,4 ± 0,2
2	21,8 ± 0,1	16,3 ± 0,3	19,8 ± 0,2	17,7 ± 0,2
3	23,6 ± 0,1	16,8 ± 0,3	20,9 ± 0,2	17,9 ± 0,2
6	28,7 ± 0,3	17,8 ± 0,3	22,0 ± 0,2	18,5 ± 0,2
7	31,0 ± 0,4	18,5 ± 0,3	22,1 ± 0,2	19,0 ± 0,2
Высота растений, % к исходному уровню				
исходный уровень	100	100	100	100
1	119*	102	111	102
2	136*	105*	119*	104*
3	148*	108*	126*	106*
6	180*	115*	132*	109*
7	194*	119*	133*	112*

Примечание. * – отличия от исходного уровня достоверности $p \leq 0,05$.

В дальнейшем нами была проанализирована динамика выхода электролитов из клеток листа растений пшеницы. Установлено, что температура 4 °C не вызывает существенных изменений в выходе электролитов из листьев на протяжении всего эксперимента (1–7 сут) (рис. 2). Действие сульфата кадмия (100 мкМ) приводило к увеличению выхода электролитов из листьев пшеницы через 1 сут от его начала, но затем (2–3-е сут) он снижался и на 6–7-е сут возвращался к исходному уровню. При совместном действии температуры 4 °C и кадмия в течение 1–3 сут также отмечено некоторое увеличение выхода электролитов, но к концу эксперимента его значения не отличались от исходного уровня (см. рис. 2). Отметим, что обнаруженное в наших опытах повышение проницаемости мембран в начальный период действия кадмия и низкой температуры считается одной из первых неспецифических реакций растений в ответ на действие неблагоприятных абиотических факторов [Чиркова, 2002].

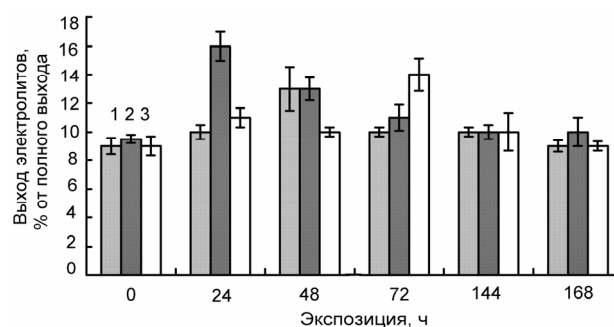


Рис. 2. Динамика выхода электролитов из листьев проростков пшеницы при действии низкой температуры 4 °C (1), сульфата кадмия (100 мкМ) (2) и при их совместном действии (3)

Таким образом, незначительные изменения в выходе электролитов при действии низкой температуры (4 °C) и кадмия в концентрации 100 мкМ свидетельствуют, что в этом случае не происходит нарушения проницаемости мембран клеток листьев пшеницы, а следовательно, и их повреждения.

На основании полученных данных можно заключить, что растения пшеницы способны успешно адаптироваться как к раздельному, так и к совместному действию пониженной температуры и кадмия в зависимости от его концентрации воздействия. В пользу этого свидетельствуют также результаты проведенного нами ранее изучения динамики холодоустойчивости проростков пшеницы [Таланова и др., 2013]. В частности, было показано, что уже в начальный период (минуты, часы) действия температуры 4 °C холодоустойчивость проростков пшеницы возрастала и

продолжала в дальнейшем увеличиваться, достигая максимума на 6–7-е сут. Под влиянием кадмия и его совместного действия с температурой 4 °C также происходило быстрое, хотя и меньшее по величине повышение устойчивости.

В целом результаты проведенного исследования характеризуют реакцию растений пшеницы на действие пониженных температур и кадмия. Причем низкая температура действует в данном случае на все растение (на корни и надземную часть), а ионы кадмия первоначально поступают в корневую систему и только по истечении некоторого времени могут попасть в побег. Поскольку пшеница относится к растениям-исключателям, т. е. к видам, у которых большая часть тяжелых металлов удерживается в корневой системе (предотвращая тем самым их поступление в надземную часть), то при поступлении кадмия в корни в начальный период его действия активируются защитные механизмы, направленные на предотвращение его поступления в побег. Тем не менее уже через 1 сут от начала действия сульфата кадмия (100 мкМ) на корни пшеницы наблюдается его поступление и накопление в листьях, а с увеличением продолжительности воздействия (2–7-е сут) его содержание продолжает там нарастать [Репкина и др., 2012]. Следует отметить, что на скорость поступления кадмия в растения оказывает влияние низкая температура [Прасад, 2003]. Изменение поглощения и транспорта кадмия по растению под влиянием температуры может, в свою очередь, способствовать повышению устойчивости растений к его действию [Pourghasemian et al., 2013].

Известно, что воздействие на растения абиотических факторов разной природы в зависимости от его интенсивности и продолжительности приводит или к нарушению многих физиолого-биохимических процессов, или к общей перестройке метаболизма, направленной на поддержание жизнедеятельности организма в изменившихся условиях [Чиркова, 2002]. Отрицательное действие тяжелых металлов на рост растений обусловлено их влиянием на деление и растяжение клеток, с одной стороны, и нарушением метаболизма, с другой стороны [Ваулина и др., 1978; Бессонова, 1991; Кошкин, 2010]. В частности, при этом происходит ингибирование фотосинтеза [Кошкин, 2010], дыхания [Башмаков, Лукаткин, 2009], нарушение гормонального баланса [Титов, Таланова, 2009] и минерального питания [Титов и др., 2007]. Совокупность этих изменений приводит к замедлению ростовых процессов и снижению накопления биомассы [Серегин, Иванов, 2001; Molnarava, Fargasova, 2012].

В то же время торможение роста является необходимым условием повышения устойчивости растений к низкой температуре [Туманов, 1979; Трунова, 2007; Войников, 2013].

Таким образом, судя по характеру изменения роста, который выступает интегральным показателем, отражающим реакцию растений на изменение условий среды, низкая температура 4 °C и сульфат кадмия в концентрации 100 мкМ не оказывают повреждающего действия на растения пшеницы. Более того, даже их совместное действие не приводит к полному торможению роста и повреждению проростков пшеницы. Подобного рода данные могут рассматриваться как проявление у растений пшеницы неспецифических ответных реакций и феномена кросс-адаптации, когда воздействие одного неблагоприятного фактора способствует повышению устойчивости к другому фактору. Как показывают многочисленные исследования, спектр неспецифических адаптивных реакций растений очень широк, включает изменения, происходящие на разных уровнях организации (от молекулярного до организменного), и во многом благодаря им растения успешно приспосабливаются и выживают в условиях раздельного и совместного действия тех или иных неблагоприятных факторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-31676 мол_а).

Литература

- Алексеева-Попова Н. В. Устойчивость к тяжелым металлам дикорастущих видов. Л.: Ботанический институт им. Комарова, 1991. 214 с.
- Башмаков Д. И., Лукаткин А. С. Эколого-физиологические аспекты аккумуляции и распределения тяжелых металлов у высших растений. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2009. 236 с.
- Бессонова В. П. Клеточный анализ роста корней *Lathyrus odoratus* L. при действии тяжелых металлов // Цитология и генетика. 1991. Т. 25, № 5. С. 18–22.
- Ваулина Э. Н., Аникеева И. Д., Коган И. Г. Влияние ионов кадмия на деление клеток корневой меристемы *Crepis capillaries* (L.) Wallr. // Цитология и генетика. 1978. Т. 12, № 6. С. 479–502.
- Войников В. К. Энергетическая и информационная системы растительных клеток при гипотермии. Новосибирск: Наука, 2013. 212 с.
- Гармаш Е. В., Головкин Т. К. Влияние кадмия на рост и дыхание ячменя при двух температурных режимах выращивания // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 3. С. 382–387.
- Гришенкова Н. Н., Лукаткин А. С. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода // Поволжский экологический журнал. 2005. № 1. С. 3–11.

Гуральчук Ж. З. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам // Физиология и биохимия культ. растений. 1994. Т. 26, № 2. С. 107–117.

Дроздов С. Н., Курец В. К., Титов А. Ф. Терморезистентность активно вегетирующих растений. Л.: Наука, 1984. 168 с.

Казнина Н. М., Титов А. Ф. Влияние кадмия на физиологические процессы и продуктивность растений семейства Poaceae // Усп. совр. биол. 2013. Т. 133, № 6. С. 588–603.

Климов С. В. Морозостойкость растений озимой пшеницы зависит от адаптации фотосинтеза и дыхания в разных временных интервалах // Изв. РАН. Сер. биол. 2009. № 3. С. 313–322.

Климов С. В., Бураханова Е. А., Дубинина И. М., Алиева Г. П., Сальникова Е. Б., Олениченко Н. А., Загоскина Н. В., Трунова Т. И. Подавление донорной функции влияет на распределение углерода и морозостойкость вегетирующих растений озимой пшеницы // Физиология растений. 2008. Т. 55, № 3. С. 340–347.

Коровин А. И. Растения и экстремальные температуры. Л.: Гидрометеиздат, 1984. 272 с.

Кошкин Е. И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. М.: Дрофа, 2010. 638 с.

Лархер В. Экология растений. М.: Мир, 1978. 384 с.

Прасад М. Н. Практическое использование растений для восстановления экосистем, загрязненных металлами // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 5. С. 768–780.

Репкина Н. С., Таланова В. В., Топчиева Л. В., Батова Ю. В., Титов А. Ф. Влияние кадмия на экспрессию генов транскрипционных факторов CBF1 и DREB1 в листьях проростков пшеницы // Труды КарНЦ РАН. 2012. № 2. С. 113–118.

Серегин Н. В., Иванов В. Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 4. С. 606–630.

Таланова В. В., Титов А. Ф., Репкина Н. С., Топчиева Л. В. Гены холодового ответа COR/LEA участвуют в реакции растений пшеницы на действие тяжелых металлов // Доклады академии наук. 2013. Т. 448, № 2. С. 242–245.

Титов А. Ф., Таланова В. В., Боева Н. П., Минаяева С. В., Солдатов С. Е. Влияние ионов свинца на рост проростков пшеницы, ячменя и огурца // Физиология растений. 1995. Т. 42, № 3. С. 457–462.

Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 172 с.

Титов А. Ф., Таланова В. В. Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. 206 с.

Трунова Т. И. Растения и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 54 с.

Туманов И. И. Физиология закалывания и морозостойкости растений. М.: Наука, 1979. 350 с.

Чиркова Т. Ф. Физиологические основы устойчивости растений. СПб: Изд-во СПб. ун-та, 2002. 244 с.

Gallego S. M., Pena L. B., Barcia R. A., Azpilicueta C. E., Iannone M. F., Rosales E. P., Zawoznik M. S., Groppa M. D., Benavides M. P. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms // Environ. Exp. Bot. 2012. Vol. 83. P. 33–46.

Grigорова B., Vaseva I., Demirevska K., Feller U. Combined drought and heat stress in wheat: changes in some heat shock proteins // Bol. Plant. 2011. Vol. 55, N 1. P. 105–111.

Hu X., Liu R., Li Y., Wang W., Tai F., Xue R., Li C. Heat shock protein 70 regulates the abscisic acid-induced antioxidant response of maize to combined drought and heat stress // Plant Growth Regul. 2010. Vol. 60. P. 225–235.

Iqbal M., Ashraf M. Changes in hormonal balance: a possible mechanism of pre-sowing chilling-induced salt tolerance in spring wheat // J. Agro. Crop Sci. 2010. Vol. 196. P. 440–454.

Molnarova M., Fargasova A. Relationship between various physiological and biochemical parameters activated by cadmium in *Sinapis alba* L. and *Hordeum vulgare* L. // Ecol. Engineer. 2012. Vol. 49. P. 65–72.

Pourghasemian N., Ehsanzadeh P., Greger M. Genotypic variation in safflower (*Carthamus* spp.) cadmium accumulation and tolerance affected by temperature and cadmium levels // Environ. Exp. Bot. 2013. Vol. 87. P. 218–226.

Sung D. Y., Kaplan F., Lee K. J., Guy C. L. Acquired tolerance to temperature extremes // Trends Plant Sci. 2003. Vol. 8, N 3. P. 179–187.

Vassilev A., Iordanov I. Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium-treated plants: a review // Bulg. J. Plant. Physiol. 1997. Vol. 23, N 3. P. 114–133.

Wenfield M. O., Lu C., Wilson I. D., Coghill J. A., Edwards K. J. Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat // Plant Biotech. J. 2010. Vol. 8. P. 749–771.

Xin Z., Browse J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures // Plant Cell Environ. 2000. Vol. 23, N 9. P. 893–902.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Репкина Наталья Сергеевна

младший научный сотрудник
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nrt9@ya.ru
тел.: (8142) 762712

Репкина, Natalia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nrt9@ya.ru
tel.: (8142) 762712

Таланова Вера Викторовна

главный научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Карелия, Россия, 185910
эл. почта: talanova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762712

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
руководитель лаб. экологической физиологии растений
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Карелия, Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769710

Букарева Ирина Викторовна

стажер-исследователь
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Карелия, Россия, 185910
эл. почта: irisha_girl89@mail.ru
тел.: (8142) 762712

Talanova, Vera

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: talanova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762712

Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: titov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769710

Bukareva, Irina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: irisha_girl89@mail.ru
tel.: (8142) 762712

УДК 597.553.2.574.3

СОВРЕМЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ И РОСТА ЧЕШУИ МАЛОТЫЧИНКОВОГО СИГА *COREGONUS LAVARETUS LAVARETUS* (*COREGONIDAE*) ОЗЕРА ИМАНДРА В УСЛОВИЯХ ИНТЕНСИВНОГО ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Е. М. Зубова, Н. А. Кашулин

Институт проблем промышленной экологии Севера Кольского научного центра РАН

Исследованы морфология и размерно-возрастные особенности чешуи малотычинкового сига *Coregonus lavaretus lavaretus* трех участков оз. Имандра, находящихся в различных условиях антропогенной нагрузки. Показана неравномерность относительной скорости роста переднего, бокового и заднего секторов чешуи в течение жизни при постоянстве ее формы. Для обратных расчислений длины рекомендовано использовать передний диагональный радиус чешуи с применением формулы Р. Ли.

К л ю ч е в ы е с л о в а: сиг *Coregonus lavaretus*, озеро Имандра, морфология чешуи, обратные расчисления.

E. M. Zubova, N. A. Kashulin. MODERN FEATURES OF THE MORPHOLOGY AND GROWTH OF SCALES IN SPARSELY RAKERED WHITEFISH *COREGONUS LAVARETUS LAVARETUS* (*COREGONIDAE*) IN LAKE IMANDRA UNDER INTENSIVE INDUSTRIAL POLLUTION

The morphology and size-age features of scales in sparsely rakered whitefish *Coregonus lavaretus lavaretus* from three localities in Lake Imandra differing in human pressure have been studied. The growth rate of anterior, lateral and posterior parts of scales during the life of the fish was uneven, whereas the scale shape was constant. It is recommended to use the anterior diagonal radius of a scale using R. Lee formula for back calculations of fish body length.

K e y w o r d s: whitefish *Coregonus lavaretus*, Lake Imandra, scale morphology, back calculations.

Введение

Изучение изменения рыбной части сообщества оз. Имандра, испытывающего многофакторное антропогенное влияние, проводятся уже более 70 лет [Крогиус, 1931; Галкин и др., 1966; Беляева и др. 1972; Решетников, 1980; Моисеенко, 1983, 2000, 2002; Моисеенко, Яковлев, 1990; Антропогенные модификации..., 2002;

Лукин и др., 2006; Решетников и др., 2011]. Основной интерес в исследованиях привлекал доминирующий комплекс озера – сиговые рыбы, в частности сиг *Coregonus lavaretus*, рекомендованный как тест-объект ихтиологического мониторинга [Моисеенко, 1991]. Большое внимание уделялось изменению ростовых характеристик рыб, динамика которых во многом определяется антропогенно-обусловленными изме-

нениями среды их обитания. Эти исследования касались не только наблюдаемых размерно-весовых параметров, но и расчисленной длины, что позволяло реконструировать особенности ростовых характеристик изучаемых рыб за период их жизни [Крогиус, 1931; Владимирская, 1956; Решетников, 1966; Беляева и др., 1972; Моисеенко, 2002; Зубова, 2013; Зубова, Кашулин, 2013]. Для сиговых рыб умеренной и субарктической зоны северного полушария наиболее часто используемой структурой для обратных расчислений является чешуя [Van Oosten, 1923; Решетников, 1966, 1980; Черешнев, Скопец, 1992; Смирнов, Смирнова-Залуми, 1993]. Особенности закладки годового кольца на чешуе у сигов бассейна оз. Имандра начала 60-х годов прошлого века были подробно описаны Ю. С. Решетниковым [1966, 1980], но морфологические особенности чешуи не приводились. В этих работах Ю. С. Решетников также приводит методические особенности обратных расчислений длины сигов оз. Имандра. Данная процедура имеет ряд особенностей: выбор регистрирующей структуры, объективно отражающей начало и конец периода роста [Дгебуадзе, 1979]; выбор оптимального участка или сектора данной структуры, что достигается подробным изучением ее морфологии и размерно-возрастной изменчивости [Брюзгин, 1969].

Чешуя как регистрирующая структура может отражать не только особенности роста рыб, но и особенности условий их обитания. Интенсивное загрязнение Имандры во второй половине 20 века вызывало нарушения развития и строения внутренних органов и структур костного и кожного скелета рыб [Моисеенко, 1983, 1991; Кашулин и др., 1999; Моисеенко, Лукин, 1999], в том числе и чешуи. Начало нынешнего века характеризуется снижением токсичной нагрузки на водоем, но интенсификацией его эвтрофирования [Кашулин и др., 2012]. Эти процессы затрудняют использование регистрирующих структур для определения возраста и исследований темпов роста, что обуславливает необходимость уточнения морфологии чешуи и методик ее использования в размерно-возрастных расчислениях [Smolyar, Bromage, 2004]. Отсутствие единых методических подходов в обратных расчислениях ростовых характеристик рыб Кольского Севера затрудняет интерпретацию полученных результатов.

Для решения перечисленных выше проблем в 2011–13 гг. нами были исследованы преднерестовые скопления сига трех плесов озера Имандра: Большой, Йокостровской и Бабинской, испытывающих разноуровневую техногенную нагрузку.

Цель данной работы: исследование современных особенностей строения чешуи сигов, обитающих в различных условиях, и уточнение методики обратных расчислений длины.

Район исследования и характеристика антропогенных воздействий

Озеро Имандра – один из крупнейших запольных водоемов (площадь 880 км²), испытывающий многофакторное антропогенное влияние. Имандра состоит из трех в значительной мере самостоятельных участков (плесов) – Большой (далее БоИ), Йокостровской (далее ЙИ) и Бабинской (далее БаИ) Имандры, соединяющихся между собой узкими проливами, в которых обитают относительно изолированные внутривидовые группировки сига (рис. 1).

Северная часть озера – БоИ – подвергается влиянию сточных вод медно-никелевого и горнорудного производства (комбинат «Североникель» и Оленегорский ГОК), а также сточных вод апатит-нефелинового производства (ОАО «Апатит»). БаИ располагается в юго-западной части оз. Имандра, наиболее удален от промышленных центров и не испытывает прямого химического загрязнения, но начиная с 1973 г. в губу Молочная плеса сбрасываются подогретые воды Кольской АЭС. ЙИ занимает промежуточное положение. В южной части данного плеса формируется сток из озера (см. рис. 1) [Антропогенные модификации..., 2002].

Материалы и методы

Все ихтиологические материалы были собраны в летне-осенний период в рамках комплексных исследований плесов БоИ и северной части ЙИ в 2012–2013 гг., БаИ в 2011 г. (см. рис. 1). Рыбу отлавливали ставными жаберными донными сетями из нейлонового монофиламента стандартной длиной 25 м, высотой 1,5 м и с размером ячеи 10, 12,5, 16, 22, 25, 30, 35, 38 и 45 мм, что обеспечивало вылов рыбы длиной от 5 см и более. Обработка материала проводилась по стандартной методике [Правдин, 1966]. Для выделения внутривидовых форм у исследуемых сигов производился подсчет количества тычинок на первой жаберной дуге [Правдин, 1966; Решетников, 1980; Siwertsson et al., 2008]. Выборка составила: БоИ – 46 экземпляров сига, ЙИ – 462 экземпляра, БаИ – 140 экземпляров.

Чешуя для исследования всегда бралась с середины тела, под передней частью спинного плавника. Просчитывался процент рыб с разрушенным центром чешуи. Для определения

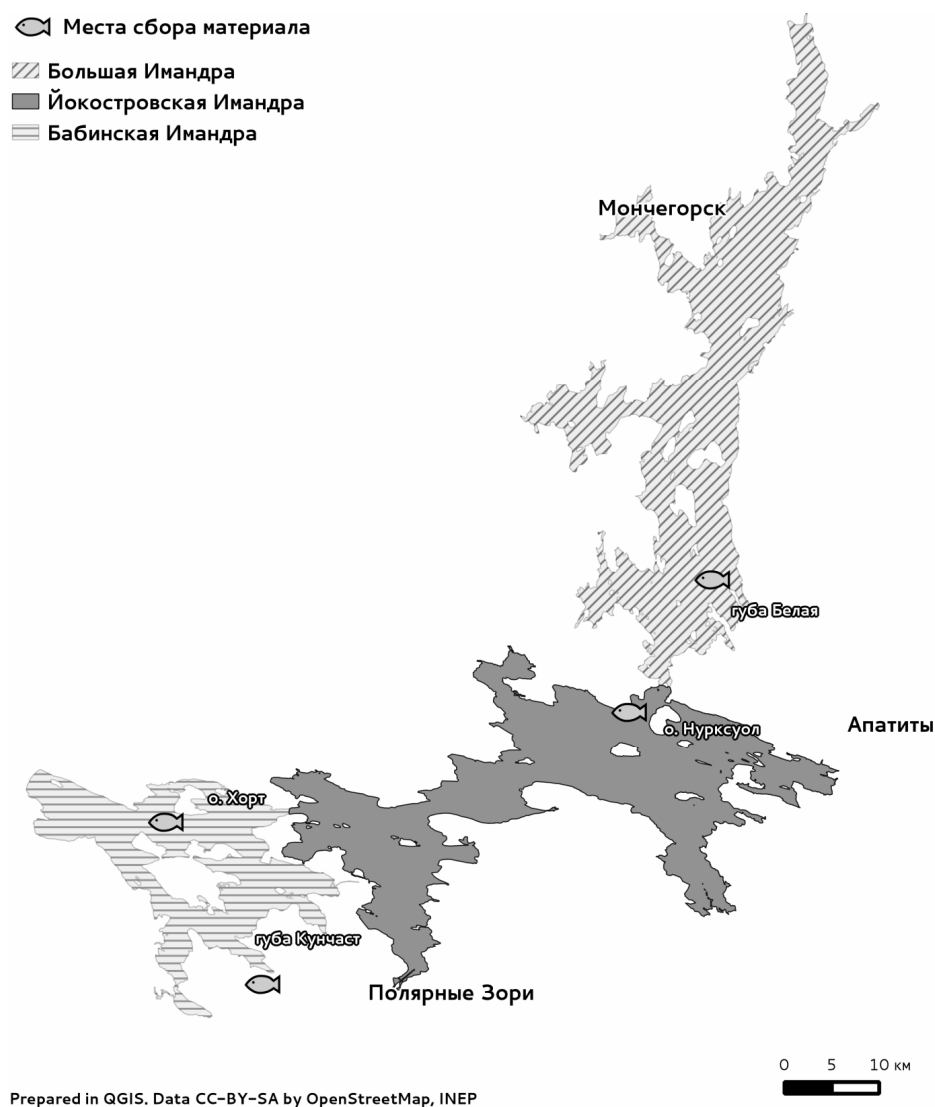


Рис. 1. Карта-схема сбора материала в оз. Имандра, 2011–2013 гг.

возраста под биноклем просматривалось 4–6 чешуй от каждого сига [Галкин, 1958; Чугунова, 1959; Чернова, Дгебуадзе, 2008]. Из каждой пробы выбиралась чешуя с наиболее ясной структурой, и с помощью окуляр-микрометра проводились измерения ее продольного, поперечного диаметров и радиусов: переднего (базального) и переднего диагонального. Боковой и задний (каудальный) радиусы не измерялись – их находили путем деления значения поперечного диаметра на 2 и вычитания из значения продольного диаметра значения переднего радиуса соответственно (рис. 2). Определялись: J – относительный размер чешуи, равный продольному диаметру (ab) в процентах от длины тела (AC); B – отношение продольного диаметра (ab) к поперечному (cd), характеризует форму (ширину) чешуи; br – передний радиус (bo), выраженный в процентах

от продольного диаметра чешуи (ab), показывает положение ядра чешуи (см. рис. 2) [Галкин, 1958; Чернова, Дгебуадзе, 2008]. Для описания возрастных изменений секторов чешуи сегов (переднего, бокового и заднего) использовали их значения в процентах от длины тела (AC) [Чугунова, 1959]. У 20 экземпляров сига из ЙИ подсчитывалось количество склеритов на переднем, боковом и заднем радиусах чешуи. Просчитывался процент рыб с разрушенным центром чешуи. За основу расчисления длины (AC) была взята формула Розы Ли [Чугунова, 1959; Брюзгин, 1969]:

$$Li = Lc(Si / Sc) + a(1 - Si / Sc),$$

где Lc – длина рыбы в момент поимки, Li – длина рыбы в возрасте i лет, Sc – радиус чешуи данной рыбы в момент ее поимки, Si – радиус чешуи этой особи в возрасте i лет, a – постоянная величина.

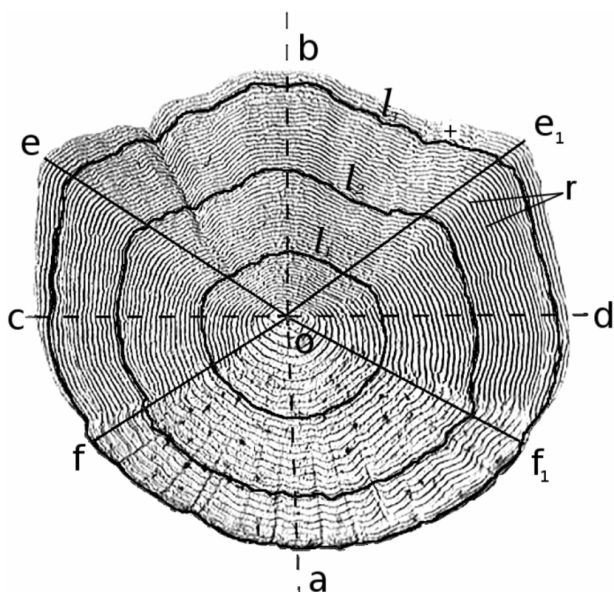


Рис. 2. Схема структуры чешуи трехгодовалого (четырёхлетнего) сига *Coregonus lavaretus* плеса Йокостровская Имандра, 2012 г. [по Галкину, 1958, с изменениями]: *o* – центр, *ab* – продольный диаметр, *cd* – поперечный диаметр, *bo* – передний (базальный) радиус, *eo* и *e,o* – передние диагональные радиусы, *so* и *do* – боковые радиусы, *fo* и *f,o* – задние диагональные радиусы, *oa* – задний (каудальный) радиус, *eoe* – передний сектор, *escf* и *escf₁* – боковые сектора, *fof₁* – задний сектор, *r* – склериты, *I₁*, *I₂*, *I₃* – годовые зоны роста [по Смирнову, Смирновой-Залуми, 1993], + – незаконченный прирост

Результаты и обсуждение

Наиболее интенсивное загрязнение оз. Имандра происходило во второй половине 20 века [Моисеенко, Яковлев, 1990; Антропогенные модификации..., 2002]. Как говорилось выше, в настоящее время в озере наблюдается снижение уровня токсичности водной среды, но интенсификация процессов эвтрофикации. Общая минерализация, содержание основных ионов, а также биогенных элементов и тяжелых металлов резко увеличивается относительно БаИ в сторону БоИ (табл. 1). Показатели ЙИ носят промежуточный характер. Соотношение уровней нагрузки биогенных элементов и тяжелых металлов определяет биологическую продуктивность плесов, проявляющуюся в пространственной динамике значений биомассы фито- и зоопланктона (табл. 2). Однако показатели биомассы бентоса высокими были в ЙИ.

Сиги из БаИ были представлены одной формой – малотычинковой (количество тычинок $22,4 \pm 0,2$). В уловах из ЙИ и БоИ встречались две формы сига – малотычинковая ($23,3 \pm 0,1$ и $24,0 \pm 0,4$ тычинок соответственно) и среднетычинковая ($37,3 \pm 2,1$ и $38,8 \pm 0,6$ тычинок). Последняя форма

составляла примерно 0,9 и 30,0 % от уловов соответственно. Присутствие среднетычинковых сигов в уловах определяется высокой трофностью этих плесов. В дальнейшем в работе приводятся данные только по малотычинковому сигу.

Таблица 1. Основные гидрохимические показатели воды в различных плесах оз. Имандра, 2011–2013 гг.

Гидрохимический показатель	Бабинская Имандра	Йокостровская Имандра	Большая Имандра
O_{21} , %	77,3	88,9	92,4
O_{21} , мг/л	7,39	8,98	9,37
pH	7,33	7,42	7,78
Общая минерализация, мг/л	39,9	70,8	91,3
PO_4^{3-} , мкгР/л	1	2	10
Р общ, мкгР/л	6	19	55
NH_4^+ , мкгN/л	10	6	15
NO_3^- , мкгN/л	18	1	166
N общ, мкгN/л	147	183	396
Сумма средних показателей тяжелых металлов в воде, мкг/л (Al, Fe, Cu, Ni, Zn, Mn, Sr, Pb, Cd)	99,2	182,5	413,4

Таблица 2. Основные гидробиологические показатели в различных плесах оз. Имандра, 2011–2013 гг.

Гидробиологический показатель	Бабинская Имандра	Йокостровская Имандра	Большая Имандра
Биомасса фитопланктона, г/м ³	0,46	1,57	2,98
Содержание хлорофилла <i>a</i> , мг/м ³	1,41	3,68	6,12
Численность зоопланктона, экз./м ³	265,5	880,2	1301,3
Биомасса зоопланктона, г/м ³	0,5	2,6	6,9
Численность бентоса, экз./м ²	224	3900	7500
Биомасса бентоса, г/м ³	1,2	44,1	36,3

По возрастным группам сига были представлены: в БаИ семью возрастными группами от 1+ до 7+ лет; в ЙИ десятью – от 0+ до 9+ лет; в БоИ – от 3+ до 7+ лет. Во всех плесах преобладали малотычинковые сиги в возрасте 3+, 4+ и 5+ лет. По длине и массе сига были представлены: из БаИ длиной 150–436 (в среднем $266,3 \pm 4,8$) мм и массой 29–1350 ($249,3 \pm 16,2$) г; в ЙИ – длиной 113–464 ($273,9 \pm 2,1$) мм и массой 15–1660 ($261,9 \pm 7,5$) г; в БоИ – длиной 212–374 ($310,7 \pm 6,3$) мм и массой 109–940 ($437,7 \pm 30,3$) г.

Морфологические особенности чешуи

Во всех исследуемых плесах оз. Имандра в пробах встречалась чешуя с разрушенной центральной областью (рис. 3, а), непригодная для определения возраста и обратных расчислений длины рыб. Ряд исследователей полагают,



а



б

Рис. 3. Чешуя с разрушенной центральной областью малотычинкового сига *C. lavaretus lavaretus* плеса Бабинская Имандра (а) в возрасте 2+ (АС = 232,0 мм), 2011–2012 гг. (увеличение: а – ок. 10 ×, об. 1,0 ×). Ерошение чешуи на теле малотычинкового сига плеса Йокостровская Имандра (б) (фотография П. М. Терентьева, 2012 г.)

что подобные изменения свойственны регенерирующей чешуе, заменяющей утраченные в результате травм или болезней нормальные склериты на нерегулярные гранулярные образования [Muir, Naas, 2003]. В условно-фоновых районах плеса БаИ такая аномалия в строении чешуи наблюдалась у 60 % исследованных рыб, при этом чешуй с аномалиями было от 5 до 75 % от количества в пробе. С возрастом частота встречаемости рыб с регенерирующей чешуей возрастала и в возрасте 7+ составляла 100 %. Схожая картина наблюдалась и у сигов БоИ. Условия обитания сигов в ЙИ носят промежуточный характер (см. табл. 1, 2), но частота встречаемости регенерирующей чешуи здесь наиболее высока – она встречалась у 90 % сигов, чешуй с аномалиями было от 5 до 90 % от количества в пробе; часто встречалась деформированная чешуя.

В ЙИ у 20 % выловленных сигов наблюдалось ерошение чешуи (рис. 3, б), чего не отмечалось у рыб БаИ и БоИ. Ерошение чешуи является основным симптомом при таких бактериальных заболеваниях рыб, как аэромонос, лепидортоз и т. д. [Чернова, Дгебуадзе, 2008], и свидетельствует о неблагоприятном бактериологическом режиме воды исследуемого плеса

и ослабленном иммунитете рыб. Отсутствие ерошения чешуи у сигов в БоИ можно объяснить подавлением роста и размножения микроорганизмов токсической средой, которую создают высокие концентрации тяжелых металлов в воде данного плеса (см. табл. 1).

Строение нормально структурированной чешуи у малотычинковых сигов разных плесов не различалось. Чешуя исследуемых рыб типичная циклоидная, центральный склерит имеет овальную форму, чаще незамкнут, область центра содержит включения, которые напоминают участки разрушенного склерита (рис. 4, а, б, в). Склериты имеются на всей поверхности чешуи – они образуют чередующиеся комплексы из «концентрических» и следующих за ними «выклинивающих» («срезанных») склеритов, которые формируют годовые зоны роста (см. рис. 4, а, б, в). Выклинивание склеритов начинается на границе бокового и заднего секторов чешуи и заканчивается на переднем секторе, поэтому здесь их большее число (табл. 3), что указывает на закладку и более интенсивный их рост в базальной части с вершины чешуи. В переднем секторе наблюдается удвоение склеритов (см. рис. 4, а, б, в; 5, а), склериты здесь слабоволнистые. Вдоль боковых секторов че-

Таблица 3. Число склеритов на переднем, переднем диагональном и заднем радиусах чешуи у малотычинкового сига *C. lavaretus lavaretus*, обитающего в плесе Йокостровская Имандра, 2012–2013 гг.

Радиус чешуи	Возраст, лет					
	1+	2+	3+	4+	5+	6+
Передний	14,9 ± 0,6	11,4 ± 1,0	12,6 ± 1,5	11,1 ± 0,9	14,3 ± 2,2	10,7 ± 2,9
Передний диагональный	13,5 ± 0,6	10,9 ± 1,0	12,0 ± 1,3	10,4 ± 1,0	13,8 ± 2,2	10,7 ± 2,9
Задний	9,7 ± 0,4	6,0 ± 0,6	5,4 ± 0,7	4,7 ± 1,0	4,2 ± 0,5	3,0 ± 0,0
Число экземпляров	20	16	12	9	6	3

Примечание. Здесь и в табл. 4, 5 представлено среднее значение и его погрешность.

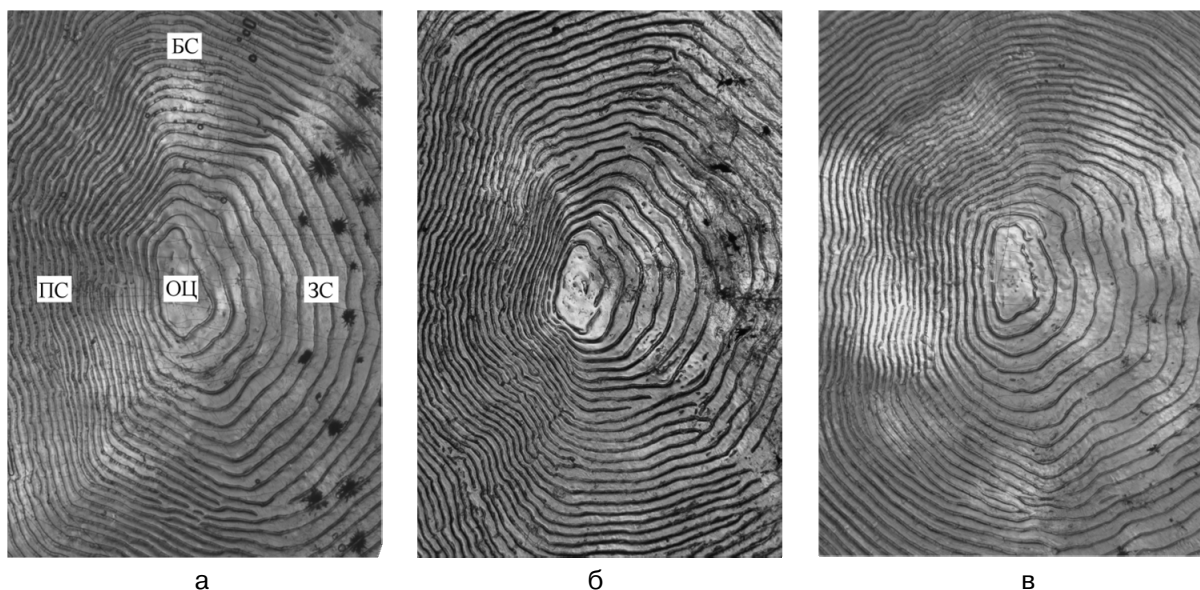


Рис. 4. Морфологические особенности чешуи малотычинкового сига *C. lavaretus lavaretus* плеса Бабинская Имандра (а) в возрасте 3+ (АС = 268,0 мм), 2011 г., плеса Йокостровская Имандра (б) в возрасте 3+ (АС = 265,0 мм), 2012 г., и плеса Большая Имандра в возрасте 3+ (АС = 293,0 мм), 2013 г.: ОЦ – область центра, ПС – передний сектор, БС – боковой сектор, ЗС – задний сектор. Увеличение: ок. 10 $\times$, об. 5 $\times$

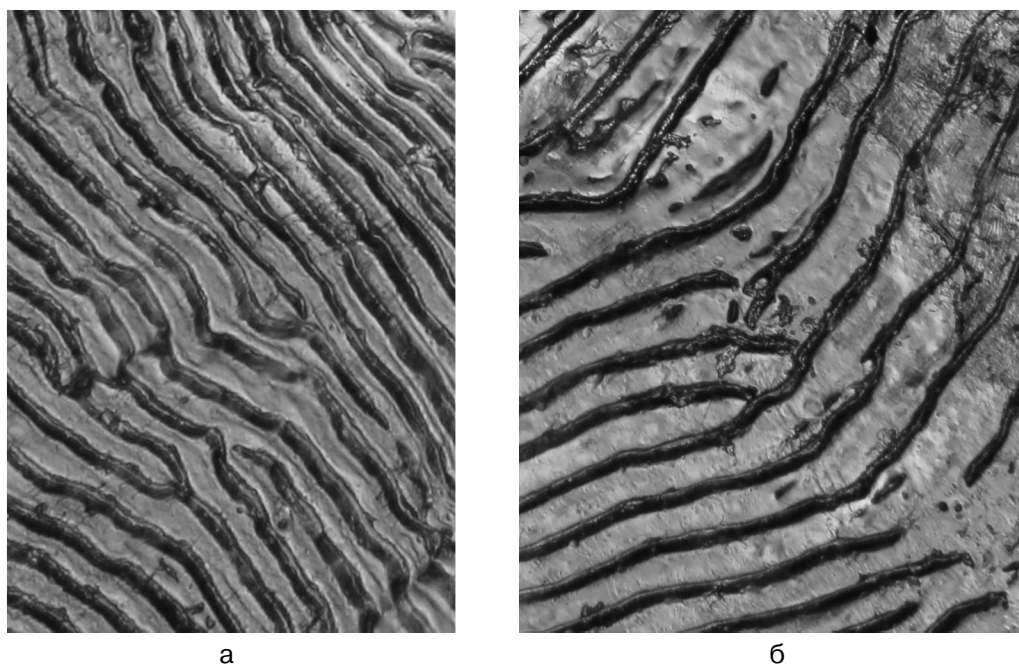


Рис. 5. Удвоение склеритов на переднем секторе чешуи (а) и «обрывание» склеритов на границе бокового и заднего секторов чешуи (б) малотычинкового сига *C. lavaretus lavaretus* плеса Йокостровская Имандра в возрасте 3+ (АС = 265,0 мм), 2012 г. Увеличение: ок. 10 $\times$, об. 20 $\times$

шуи в результате утери склеритов расстояние между ними незначительно больше; гораздо большие расстояния наблюдаются между склеритами на заднем секторе (см. рис. 4, а, б, в), что объясняется дополнительной потерей некоторых склеритов на границе бокового и заднего секторов чешуи, они как бы «обрываются» (см. рис. 4, а, б, в; 5, б).

Размерно-возрастные изменения морфологии чешуи

Размерно-возрастных различий в морфологии чешуи у малотычинковых сигов из разных плесов не выявлено. Относительный размер чешуи у исследуемых рыб достоверно увеличивается с возрастом, при этом центр чешуи сдвигается к заднему (каудальному) краю ($p > 0,95$)

Таблица 4. Относительный размер чешуи (J), %, форма чешуи (B) и относительное положение ядра чешуи (br), %, малотычинкового сига *C. lavaretus lavaretus*, обитающего в различных плесах оз. Имандра, 2011–2013 гг.

Показатель морфологии чешуи	Возраст, лет									
	0+	1+	2+	3+	4+	5+	6+	7+	8+	9+
Бабинская Имандра										
J	-	1,55	$1,54 \pm 0,04$	$1,58 \pm 0,04$	$1,70 \pm 0,03$	$1,72 \pm 0,04$	$1,76 \pm 0,06$	$1,82 \pm 0,06$	-	-
B	-	0,95	$0,98 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,02$	$1,02 \pm 0,02$	$1,03 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,02$	-	-
br	-	45,1	$47,5 \pm 1,6$	$49,2 \pm 1,2$	$54,4 \pm 0,7$	$54,7 \pm 0,8$	$57,4 \pm 1,0$	$59,0 \pm 1,8$	-	-
Число экземпляров	-	1	19	26	39	28	18	9	-	-
Йокостровская Имандра										
J	$1,56 \pm 0,03$	$1,39 \pm 0,04$	$1,49 \pm 0,05$	$1,62 \pm 0,02$	$1,63 \pm 0,01$	$1,69 \pm 0,02$	$1,74 \pm 0,03$	$1,75 \pm 0,07$	$1,84 \pm 0,14$	$1,71$
B	$1,06 \pm 0,06$	$0,95 \pm 0,01$	$0,97 \pm 0,02$	$0,97 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,01$	$0,98 \pm 0,01$	$0,97 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,15$	$0,97$
br	$38,9 \pm 0,0$	$43,4 \pm 0,8$	$47,0 \pm 0,9$	$51,8 \pm 0,4$	$52,5 \pm 0,3$	$53,6 \pm 0,3$	$56,0 \pm 0,6$	$58,2 \pm 1,2$	$58,8 \pm 5,9$	$53,2$
Число экземпляров	2	18	22	107	156	100	39	11	2	1
Большая Имандра										
J	-	-	$1,56 \pm 0,06$	$1,60 \pm 0,05$	$1,67 \pm 0,05$	$1,82 \pm 0,09$	$1,60 \pm 0,10$	$1,77 \pm 0,07$	-	-
B	-	-	$1,02 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,05$	$0,95 \pm 0,05$	$0,96 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,06$	-	-
br	-	-	$47,4 \pm 0,6$	$50,1 \pm 2,0$	$52,4 \pm 1,0$	$55,4 \pm 1,9$	$55,0 \pm 1,6$	$57,5 \pm 0,2$	-	-
Число экземпляров	-	-	4	4	12	7	7	2	-	-

(табл. 4). Эти изменения происходят из-за различного роста переднего и заднего секторов чешуи сига в разном возрасте. Так, передний сектор чешуи, включающий передний и передний диагональный радиусы, относительно длины тела (AC) с возрастом увеличивается; задний сектор, включающий, в нашем случае, измерения заднего радиуса, – уменьшается ($p > 0,95$) (табл. 5); боковой сектор чешуи сига, включающий боковой радиус, с возрастом увеличивается относительно длины тела ($p > 0,95$) (см. табл. 5). Описанные закономерности иногда не прослеживаются у сигов старшевозрастных групп ЙИ (8+ и 9+) и БоИ (6+ и 7+), что, возможно, связано с небольшим количеством особей в представленных возрастных группировках.

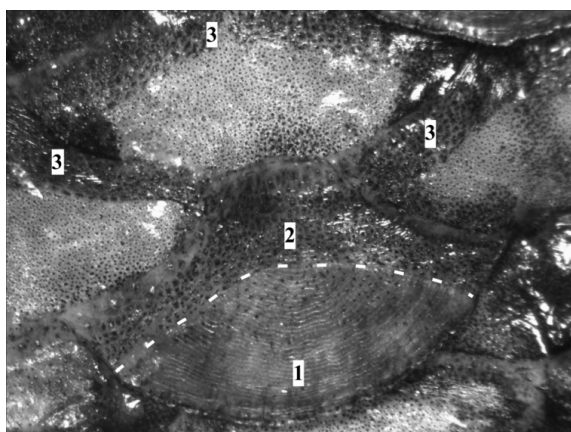


Рис. 6. Расположение чешуи в чешуйном кармане малотычинкового сига *C. lavaretus lavaretus* плеса Йокостровская Имандра в возрасте 6+ ($AC = 464,0$ мм), 2012 г. 1 – задний (каудальный) сектор чешуи, 2 – чешуйный карман, 3 – чешуйные карманы прилегающих чешуй. Увеличение: ок. 10 $\times$, об. 1 $\times$

В результате роста рыбы увеличивается поверхность, которую надо покрыть чешуей, что обуславливает увеличение переднего сектора чешуи, располагающегося внутри чешуйного кармана. В нашем случае это можно отнести и к боковому сектору, расположенному внутри чешуйного кармана (рис. 6). Рост разных частей чешуи может зависеть и от степени развития эпидермиса вне чешуйного кармана [Чернова, Дгебуадзе, 2008].

Несмотря на изменения роста секторов чешуи, форма чешуи (B) сигов остается постоянной на протяжении всей жизни рыб, то есть пропорции продольного диаметра чешуи к поперечному диаметру с возрастом практически не меняются (см. табл. 4).

Уточнение методики обратных расчетов длины

В основе обратных расчетов длины лежит утверждение о наличии связи между длиной тела и размерами чешуи. У сигов Имандры зависимость между длиной тела (AC) и различными радиусами чешуи (передним, передним диагональным, боковым и задним) лучше описывается уравнением степенной функции (табл. 6). У сигов всех возрастов число годовых колец одно и то же по разным радиусам чешуи. Для обратных расчетов мы выбирали передний диагональный радиус, так как по нему регрессия длины лучше описывается уравнением степенной функции (см. табл. 6). Анализ структуры чешуи также показал, что по этому радиусу возможно более четкое фиксирование годовых зон у исследуемых рыб.

Таблица 5. Изменение величины переднего, переднего диагонального, бокового и заднего радиусов чешуи относительно длины тела с возрастом (AC), %, малотычинкового сига *C. lavaretus lavaretus*, обитающего в различных плесах оз. Имандра, 2011–2013 гг.

Радиус чешуи	Возраст, лет									
	0+	1+	2+	3+	4+	5+	6+	7+	8+	9+
Бабинская Имандра										
Передний	-	0,70	0,74 ± 0,04	0,78 ± 0,03	0,92 ± 0,02	0,93 ± 0,03	1,02 ± 0,05	1,07 ± 0,06	-	-
Передний диагональный	-	0,85	0,86 ± 0,03	0,87 ± 0,03	1,00 ± 0,02	1,01 ± 0,04	1,09 ± 0,05	1,15 ± 0,08	-	-
Боковой	-	0,85	0,79 ± 0,02	0,81 ± 0,04	0,85 ± 0,02	0,85 ± 0,02	0,86 ± 0,03	0,91 ± 0,02	-	-
Задний	-	0,85	0,81 ± 0,02	0,80 ± 0,02	0,77 ± 0,01	0,76 ± 0,01	0,74 ± 0,02	0,74 ± 0,02	-	-
Число экземпляров	-	1	19	26	39	28	18	9	-	-
Йокостровская Имандра										
Передний	0,61 ± 0,01	0,61 ± 0,03	0,71 ± 0,03	0,84 ± 0,02	0,86 ± 0,02	0,91 ± 0,02	0,98 ± 0,02	1,02 ± 0,06	1,07 ± 0,21	0,91
Передний диагональный	0,69 ± 0,01	0,77 ± 0,02	0,83 ± 0,03	0,93 ± 0,01	0,94 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,07 ± 0,02	1,13 ± 0,04	1,14 ± 0,16	1,02
Боковой	0,74 ± 0,02	0,73 ± 0,02	0,78 ± 0,02	0,83 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,85 ± 0,01	0,89 ± 0,02	0,90 ± 0,04	0,99 ± 0,06	0,89
Задний	0,95 ± 0,02	0,78 ± 0,02	0,78 ± 0,02	0,78 ± 0,01	0,77 ± 0,01	0,76 ± 0,01	0,76 ± 0,01	0,72 ± 0,02	0,77 ± 0,06	0,80
Число экземпляров	2	18	22	107	156	100	39	11	2	1
Большая Имандра										
Передний	-	-	0,74 ± 0,04	0,86 ± 0,06	0,88 ± 0,04	1,02 ± 0,09	0,89 ± 0,08	1,02 ± 0,04	-	-
Передний диагональный	-	-	0,83 ± 0,03	0,96 ± 0,04	1,02 ± 0,04	1,16 ± 0,06	0,98 ± 0,05	1,16 ± 0,08	-	-
Боковой	-	-	0,77 ± 0,03	0,84 ± 0,02	0,87 ± 0,04	0,99 ± 0,03	0,83 ± 0,03	0,98 ± 0,10	-	-
Задний	-	-	0,82 ± 0,03	0,79 ± 0,03	0,79 ± 0,02	0,81 ± 0,03	0,72 ± 0,03	0,75 ± 0,03	-	-
Число экземпляров	-	-	4	4	12	7	7	2	-	-

Таблица 6. Коэффициенты детерминации, определяющие степенную зависимость между длиной тела (AC), мм, и размерами чешуи по различным радиусам малотычинкового сига *C. lavaretus lavaretus*, обитающего в различных плесах оз. Имандра, 2011–2013 гг.

Радиусы	R^2 при линейной зависимости	R^2 при степенной зависимости	Число экземпляров
Бабинская Имандра			
Передний	0,75	0,77	140
Передний диагональный	0,75	0,78	140
Боковой	0,71	0,75	140
Задний	0,75	0,77	140
Йокостровская Имандра			
Передний	0,73	0,76	456
Передний диагональный	0,74	0,77	456
Боковой	0,69	0,73	456
Задний	0,70	0,73	456
Большая Имандра			
Передний	0,55	0,63	33
Передний диагональный	0,68	0,74	33
Боковой	0,63	0,64	33
Задний	0,62	0,65	33

Линия регрессии длины по переднему диагональному радиусу чешуи у всех исследуемых группировок сига не проходит через начало координат, поэтому для обратных расчислений длины рыб предпочтительнее использовать формулу Р. Ли [Брюзгин, 1969; Мина, 1981]. Для обратных расчислений длины сигов из оз. Имандра

мы логарифмировали уравнение степенной функции $L = a \cdot R^b$, получали $-\ln L = \ln a + b \cdot \ln R$ и расчисляли по Ли, но вместо абсолютных значений переменных брали их логарифмы: $\ln L_i = \ln a + \ln R_i / \ln R \cdot (\ln L - \ln a)$.

Заключение

Эвтрофикация и неблагоприятный бактериологический режим вод Йокостровской Имандры приводит к снижению иммунитета у рыб и выраженным воспалительным заболеваниям их кожных покровов, что проявляется в ерошении чешуи и, возможно, является причиной высокого процента рыб с регенерирующей чешуей. Отсутствие такой картины у сигов из наиболее антропогенно-трансформированного плеса Большой Имандры, вероятно, вызвано токсичностью водной среды, обусловленной высокими концентрациями тяжелых металлов, подавляющих рост и размножение условно-патогенных микроорганизмов.

Морфология и размерно-возрастные изменения нормально структурированной чешуи у малотычинковых сигов из разных плесов не различались. Различные сектора данной минерализованной структуры в течение жизни у исследуемых рыб относительно длины тела (AC) растут неодинаково: передний и боковой сек-

тора чешуи увеличиваются с возрастом, задний сектор – уменьшается; форма чешуи остается постоянной.

Для обратных расчислений длины (АС) малотычинковых сигов из всех участков оз. Имандра рекомендуется снимать размеры годовых колец с переднего диагонального радиуса чешуи. Предпочтительно использовать для обратных расчислений длины рыб формулу Р. Ли [Брюзгин, 1969; Мина, 1981].

Литература

- Антропогенные модификации экосистемы озера Имандра // Отв. ред. Т. И. Моисеенко. М.: Наука, 2002. 403 с.
- Брюзгин В. Л. Методы изучения роста рыб по чешуе, костям и отолитам. Киев: Наукова думка, 1969. 188 с.
- Беляева Г. В., Чижигов В. В., Воробьева Д. Г., Дольник Т. В., Косинова Т. Р. Комплексное изучение и охрана оз. Имандра: науч.-исслед. отчет // Фонды КНЦ РАН. Апатиты, 1972. 339 с.
- Владимирская М. И. Сиги бассейна оз. Имандра // Вопр. ихтиологии. 1956. № 6. С. 136–148.
- Галкин Г. Г. Атлас чешуи пресноводных костистых рыб // Изв. Всесоюз. НИИ озern. и речн. рыб. хоз-ва, 1958. Т. 46. 105 с.
- Галкин Г. Г., Колюшев А. А., Покровский В. В. Ихтиофауна водохранилищ и озер Мурманской области // Рыбы Мурманской области. Условия обитания, жизнь и промысел. Мурманск: Изд-во ПИНРО, 1966. С. 177–193.
- Дгебуадзе Ю. Ю. Рост леща в водоемах разных широт // Изменчивость рыб пресноводных экосистем. М.: Наука, 1979. С. 74–92.
- Зубова Е. М. Рост сига губы Молочная плеса Бабинская Имандра // Актуальные вопросы рационального использования водных биологических ресурсов: мат-лы Первой науч. школы молодых учен. и спец-тов по рыб. хоз-ву и экологии, посвященной 100-летию со дня рождения проф. П. А. Моисеева. М.: Изд-во ВНИРО, 2013. С. 365.
- Зубова Е. М., Кашулин Н. А. Особенности и закономерности темпа роста сига Бабинской Имандры в различных условиях антропогенной нагрузки // Современные проблемы водохранилищ и их водосборов: Тр. междунар. науч.-практ. конф. Т. 3. Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2013. С. 109–114.
- Кашулин Н. А., Лукин А. А., Амундсен П. А. Рыбы пресноводных вод Субарктики как биоиндикаторы техногенного загрязнения. Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 1999. 142 с.
- Кашулин Н. А., Даувадьер В. А., Денисов Д. Б., Валькова С. А., Вандыш О. И., Терентьев П. М. Современные проблемы пресноводных ресурсов Мурманской области // Экологические проблемы северных регионов и пути их решения: сб. науч. статей. Часть 1. Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 2012. С. 235–239.
- Крогиус Ф. В. Предварительный отчет о работе экспедиции на Умбозере и оз. Имандра летом 1930 г. // Тр. Ленингр. науч.-исслед. ихтиол. ин-та, 1931. С. 13–25.
- Лукин А. А., Шарова Ю. Н., Прищепа Б. Ф. Влияние промысла на состояние популяций сига *Coregonus lavaretus* L. в оз. Имандра // Вопр. ихтиологии. 2006. Т. 46, № 5. С. 383–391.
- Мина М. В. Задачи и методы изучения рыб в природных условиях // В кн.: Современные проблемы ихтиологии. М.: Наука, 1981. С. 177–195.
- Моисеенко Т. И. Влияние на рыб загрязнения субарктического водоема (на примере оз. Имандра): дис. ... канд. биол. наук. Л.: ГосНИОРХ, 1983. 228 с.
- Моисеенко Т. И. Закисление и загрязнение тяжелыми металлами поверхностных вод Кольского Севера. Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 1991. 47 с.
- Моисеенко Т. И. Морфологические перестройки организма рыб под влиянием загрязнения (в свете теории Шварца) // Экология. 2000. № 6. С. 463–313.
- Моисеенко Т. И. Изменение стратегии жизненного цикла рыб под воздействием хронического загрязнения вод // Экология. 2002. № 1. С. 50–60.
- Моисеенко Т. И., Лукин А. А. Патологии рыб в загрязняемых водоемах Субарктики и их диагностика // Вопр. ихтиологии. 1999. Т. 39, № 4. С. 535–547.
- Моисеенко Т. И., Яковлев В. А. Антропогенные преобразования водных экосистем Кольского Севера. Л.: Наука, 1990. 219 с.
- Правдин И. Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищ. пром-ть, 1966. 376 с.
- Решетников Ю. С. Особенности роста и созревания сигов в водоемах Севера // Закономерности динамики численности рыб Белого моря и его бассейна. М.: Наука, 1966. С. 93–155.
- Решетников Ю. С. Экология и систематика сиговых рыб. М.: Наука, 1980. 301 с.
- Решетников Ю. С., Терещенко В. Г., Лукин А. А. Динамика рыбной части сообщества в изменяющихся условиях обитания (на примере оз. Имандра) // Рыбное хоз-во. 2011. № 6. С. 48–51.
- Смирнов В. В., Смирнова-Залуми Н. С. Формирование годовых зон роста на чешуе байкальского омуля *Coregonus autumnalis migratorius* // Вопросы ихтиологии. 1993. Т. 33, № 1. С. 121–129.
- Черешнев И. А., Скопец М. Б. Новые данные по биологии омуля *Coregonus subautumnalis* бассейна реки Пенжины // Вопросы ихтиологии. 1992. Т. 32, № 2. С. 42–52.
- Чернова О. Ф., Дгебуадзе Ю. Ю. Архитектоника чешуи костистых рыб и ее диагностическое значение. М.: Наука, 2008. 136 с.
- Чугунова Н. И. Руководство по изучению возраста и роста рыб. М.: Изд-во АН СССР, 1959. 164 с.
- Muir A., Haas T. Manual of standart methods for the Chippewas of Nawash calcified structure analysis facility // Chippewas of Nawash First Nation, Fish Assessment Program. Canada. 2003. 59 p.
- Siwertsson A., Knudsen R., Amundsen P.-A. Temoral stability in gill raker numbers of subarctic European whitefish populations // Advanc. Limnol. 2008. N 63. 229–240 p.

Smolar I., Bromage T. Discrete model of fish scale incremental pattern: a formalization of the anisotropic structure // ICES journal of marine science. 2004. Vol. 61. 992–1003 p.

Van Oosten J. The whitefishes (*Coregonus clupeaformis*). A study of the scales of whitefishes of known ages // Zoologica. 1923. Vol. II, N 17. 381–412 p.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Зубова Елена Михайловна

аспирант, младший научный сотрудник
лаб. водных экосистем
Институт проблем промышленной экологии Севера
Кольского научного центра РАН
Академгородок 14а, Апатиты, Мурманская обл., 184209
эл. почта: zubova@inep.ksc.ru
тел.: (81555) 74964

Zubova, Elena

Institute of the North Industrial Ecology Problems,
Kola Science Centre, Russian Academy of Sciences
14a Akademgorodok, 184209 Apatity,
Murmansk Region, Russia
e-mail: zubova@inep.ksc.ru
tel.: (81555) 74964

Кашулин Николай Александрович

зам. директора по научной работе, зав. лаб. водных
экосистем, д. б. н., проф.
Институт проблем промышленной экологии Севера
Кольского научного центра РАН
Академгородок 14а, Апатиты, Мурманская область, 184209
эл. почта: nikolay@inep.ksc.ru
тел.: (81555) 74964

Kashulin, Nikolay

Institute of the North Industrial Ecology Problems,
Kola Science Centre, Russian Academy of Sciences
14a, Akademgorodok, 184209 Apatity,
Murmansk Region, Russia
e-mail: : nikolay@inep.ksc.ru
tel.: (81555) 74964

УДК 574.24:57.045:594.1

УРОВЕНЬ ГЛУТАТИОНА И АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ В ТКАНЯХ МИДИИ *MYTILUS EDULIS* L. ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ СРЕДЫ

**И. В. Суховская, Е. В. Борвинская, И. Н. Бахмет, Н. Н. Немова,
Л. П. Смирнов**

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучено влияние изменения температуры на содержание восстановленного глутатиона (GSH) и активность глутатион S-трансферазы (GST) в жабрах и гепатопанкреасе сублиторальных мидий *Mytilus edulis* L. из Белого моря. В ходе эксперимента мидий подвергали воздействию повышенной температуры (+8 °C) в течение 24 часов, с последующим возвратом в исходные лабораторные условия (0...+2 °C) в течение 72 часов. Показано, что как повышение, так и последующее понижение температуры влияет на содержание восстановленного глутатиона и активность глутатион S-трансферазы. При этом тренд изменений совпадает в жабрах и гепатопанкреасе моллюсков, тогда как уровень изученных показателей, а также сила и скорость ответной реакции тканеспецифичны.

К л ю ч е в ы е с л о в а: температурные адаптации, восстановленный глутатион, глутатион S-трансфераза, мидия обыкновенная.

**I. V. Sukhovskaya, E. V. Borvinskaya, I. N. Bakhmet, N. N. Nemova,
L. P. Smirnov. THE LEVEL OF GLUTATHIONE AND THE ACTIVITY OF
GLUTATHIONE S-TRANSFERASE IN MUSSELS *MYTILUS EDULIS* L.
UNDER TEMPERATURE VARIATIONS**

The effect of temperature alterations on the content of reduced glutathione (GSH) and glutathione S-transferases (GST) activity in the gills and hepatopancreas of sublittoral mussels *Mytilus edulis* L. from the White Sea was studied. During the experiment the mussels were subjected to an increased temperature (+8 °C) for 24 hours with the following 72-hour recovery to the initial conditions (0...+2 °C). It is shown that both the increase, and the subsequent fall of the temperature altered the reduced glutathione content and the activity of glutathione S-transferase. The studied biomarkers in gills and digestive glands changed in a similar manner, whereas the level, force and time of the response were tissue-specific.

Key words: temperature adaptation, glutathione, glutathione S-transferase, *Mytilus edulis*.

Введение

Все аэробные организмы являются субъектами определенного уровня физиологического

окислительного стресса, возникающего в результате редокс-процессов в клетках. Результатом всех видов внешних воздействий, приводящих к стрессу, в том числе и индуцированно-

му температурными вариациями, является рост уровня свободных радикалов в клетках, включая активные формы кислорода (АФК). Кислород стимулирует развитие окислительного стресса, превышающего диапазон физиологических значений, и ответную реакцию системы антиоксидантной защиты, важными компонентами которой являются трипептид глутатион (GSH) и фермент фазы II биотрансформации ксенобиотиков – глутатион S-трансфераза (GST) [Hayes, Strange 1995; Lesser, 2006]. Биологическая роль GSH заключается в следующем: указанное соединение непосредственно или как субстрат GST связывается с различными органическими радикалами и АФК, что приводит к их обезвреживанию и способствует их выведению из организма. Этим обусловлена важная роль данных компонентов метаболизма в формировании резистентности организма к самым различным химическим и физическим воздействиям, в том числе к изменению температурного режима [Meister, Anderson, 1983; Meister, 1994; Gonzalez, 1995].

В процессе эволюции организмы освоили довольно широкий (в масштабах земных условий) термический диапазон, который достигает 100 °C. Однако температурные границы выживания у конкретного вида, в особенности у эктотермных животных, намного уже и не превышают 20–30 °C [Hochachka, Somero, 2002; Смирнов, Богдан, 2007]. Поэтому среди множества приспособительных свойств, присутствующих у живых систем, главным, несомненно, является способность адаптироваться к изменениям термического режима – к критическому фактору выживания всех эктотермных организмов. Для водных пойкилотермов быстрое изменение температуры воды является серьезной нагрузкой на их физиологическое состояние. Если постепенное изменение температуры может быть компенсировано на физиологическом и биохимическом уровне, то быстрое изменение нарушает гомеостаз и вызывает стресс [Kaur et al., 2011].

Некоторые эктотермы, например мидии (*Mytilus edulis* L.) из популяций, сосредоточенных в приливно-отливной зоне Белого моря (животным свойствен малоподвижный образ жизни, что делает их удобными модельными объектами для разного рода исследований), адаптированы к постоянным и достаточно серьезным колебаниям термического режима, которые могут достигать 35 °C в течение короткого промежутка времени. Моллюски сублиторальных популяций обитают в условиях относительно стабильной температуры и поэтому имеют более узкий диапазон термотолерант-

ности [Anestis et al., 2008]. Возникает вопрос: смогут ли мидии сублиторальных популяций выжить, если их перенести в условия температурного шока, и какие биохимические механизмы могут быть задействованы у них при реализации ответных реакций.

В задачу настоящего исследования входило изучение влияния теплового шока на содержание восстановленного глутатиона (GSH) и активность глутатион-S-трансферазы (GST) в тканях сублиторальных мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря.

Материалы и методы

Объект исследования

Сбор мидий проводили с обрастаний искусственных субстратов экспериментальной маркикультуры в бухте Круглая (губа Чупа Канда-лакшского залива, на базе Беломорской биологической станции «Картеш» ЗИН РАН) с глубины 1,5–2,0 м в марте 2013 г. Перед началом эксперимента животных в течение семи суток акклиматизировали в аквариумах с аэрируемой водой при постоянной температуре (0...+2 °C) и смене воды с соленостью 25 ‰ (контрольная точка), что считается достаточным для формирования физиологического гомеостаза [Бахмет, 2009]. В ходе 96-часового эксперимента по влиянию последовательно сменяющихся друг друга видов термошока и являющегося частичной имитацией температурного воздействия на мидий, обитающих на литорали, моллюсков сначала подвергли воздействию повышенной температуры (+8 °C) в течение 24 часов (тепловой шок). Через сутки животные были возвращены в исходные условия (0...+2 °C) (холодовой шок). Отбор проб проводили через 1 и 24 часа после воздействия теплового шока, затем через 1, 24 и 72 часа после холодового шока.

Приготовление образца ткани

Исследовали жабры и гепатопанкреас мидий. Образцы тканей замораживали в жидком азоте, хранили при –80 °C до использования. Навеску ткани 0,1–0,2 г гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера-Эльвейэма с 1–2 мл 0,05 М трис-HCl буфера и 5 мМ этилендиамин-тетрауксусной кислоты (ЭДТА) (pH 7,4). Центрифугировали при 105 000 g в течение 1 ч при 4 °C на центрифуге Beckman Coulter 80L.

Определение концентрации растворимого белка в ткани

Полученный после центрифугирования гомогенат разбавляли в 100 раз и измеряли в образце концентрацию белка методом прямого спек-

трометрического определения по величине поглощения раствора гомогената при 205 нм [Noble, Bailey, 2009; Суховская и др., 2010].

Определение концентрации GSH

Растворимые белки гомогената осаждали с помощью 5%-й трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 2500 g в течение 15 мин. Концентрацию восстановленного глутатиона в полученном супернатанте определяли, используя модифицированные методики Cohn, Lyle [1966] и Hissin, Hilf [1976].

Полученный супернатант нейтрализовали до pH 8,5, добавляли 0,4 М трис-HCl буфер (pH 8,5), содержащий 5мМ ЭДТА, и вносили 0,01%-й раствор орто-фталового альдегида (OPT) (Sigma-Aldrich, Австрия) на метаноле, приготовленный непосредственно перед использованием. После перемешивания инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин и проводили измерения на спектрофлуориметре CM 2203 (Беларусь) при E_m – 420 нм, E_x – 350 нм.

Концентрацию глутатиона определяли с помощью калибровочного графика, построенного по результатам измерений серии растворов GSH (Sigma-Aldrich) с концентрацией от 0,5 до 20 мкг/мл на 0,4 М трис-HCl буфере (pH 8,5) 5мМ ЭДТА. Для нивелировки различий с условиями эксперимента в калибровочные растворы добавляли ТХУ и щелочь.

Относительную концентрацию глутатиона выражали в мкг GSH на мг белка в ткани.

Определение активности GST

Активность GST определяли по скорости связывания восстановленного глутатиона с субстратом 1-хлор-2,4-динитробензолом (CDNB) [Habig et al., 1974]. В кварцевую кювету (длина оптического пути 1 см) вносили 0,9 мл реакционной смеси, содержавшей 1 мМ CDNB и 1 мМ GSH в 0,125 М фосфатном буфере (pH 6,5). Реакцию начинали добавлением 0,1 мл раствора гомогената и в непрерывном режиме фиксировали нарастание оптической плотности раствора в течение пяти минут при 20 °C при постоянном перемешивании на спектрофлуориметре CM 2203 (Белоруссия). Относительную активность фермента в тканях рыб выражали в единицах активности фермента в пересчете на мг белка в ткани (ед. акт./мг белка), где 1 единица активности равна количеству нМ продукта реакции, образовавшихся за минуту.

Математический анализ полученных результатов производили с помощью непараметрических критериев: Манна-Уитни и рангового ко-

эффициента корреляции Спирмена. Порог доверительной вероятности при оценке достоверности различий принят равным 0,95.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что в жабрах акклиматизированных моллюсков (начальная точка отсчета) содержалось в 14 раз больше GSH, чем в гепатопанкреасе (рис. 1). Эта разница в процессе эксперимента возрастала до 100-кратной величины. Данный факт можно объяснить тем, что в жабрах, как органе, непосредственно связанном с дыханием и наиболее чувствительном к воздействиям разного рода [Ivanina et al., 2008; Trevisan et al., 2012; McCarthy et al., 2013], выше, чем в гепатопанкреасе уровень окислительного стресса и, соответственно, интенсивность образования АФК, для нейтрализации которых требуются значительные концентрации GSH.

Аналогичная закономерность показана и для активности GST, которая в жабрах в 6 раз превышала таковую в гепатопанкреасе, а максимальные различия, выявленные в ходе эксперимента, достигали 16-кратных значений (рис. 2). Такое распределение активности фермента по органам у этого вида мидий, а также у черноморской мидии (*M. galoprovincialis*) показано и другими исследователями [Sheehan, Power, 1999; Bebianno et al., 2007]. Стоит отметить, что для подавляющего большинства видов животных максимальное содержание глутатион S-трансфераз обнаруживается в тканях, выполняющих функцию печени как основного органа биотрансформации ксенобиотиков. Вероятно, у фильтрующих организмов, таких как двусторчатые моллюски, жабры, кроме дыхательных функций, играют также, наряду с гепатопанкреасом, существенную роль в защите животного от повреждающего действия разнообразных стресс-факторов.

Через 1 час после начала воздействия теплового шока уровень GSH в жабрах возрос почти в два раза, что может являться компенсаторной реакцией на рост уровня АФК в результате стресса, вызванного резким изменением температуры воды (см. рис. 1). Через 24 часа у мидий начался процесс акклимации к новой температуре, уровень окислительного стресса соответственно снизился, поэтому содержание GSH в жабрах вернулось к контрольным значениям.

Через час после возвращения животных к исходной температуре (0 °C), то есть когда мидий фактически ввели в состояние холодового шока, уровень GSH несколько снизился, а через 24 часа его содержание увеличилось

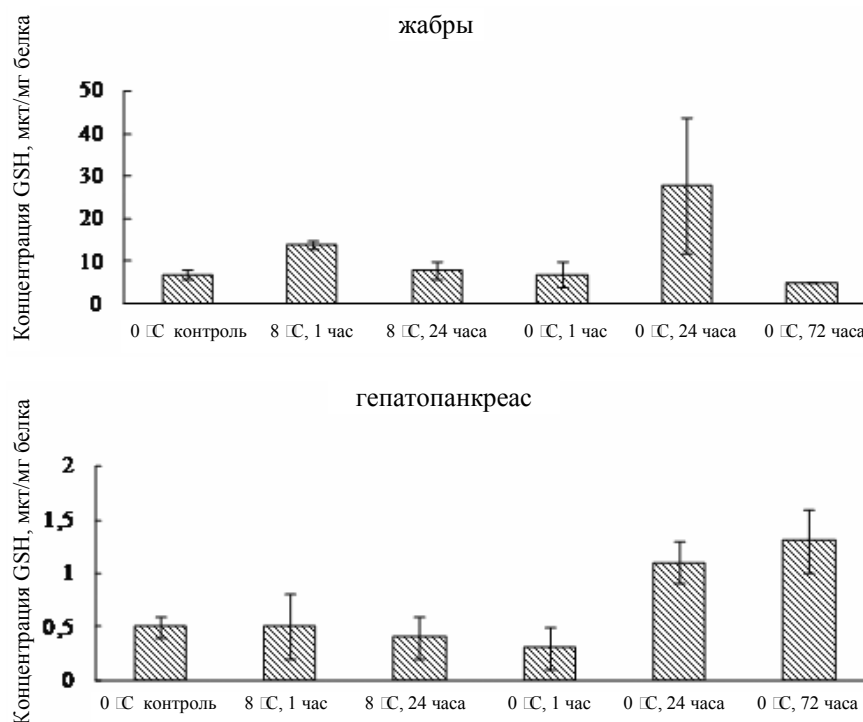


Рис. 1. Изменение уровня GSH в жабрах и гепатопанкреасе мидий при термошоке

в 4 раза относительно контрольных значений. Через 72 часа концентрация GSH вернулась к контрольным значениям.

В гепатопанкреасе в течение первых 25 часов эксперимента (см. рис. 1) наблюдалось не-

значительное снижение концентрации GSH, вне зависимости от типа термошока, через 48 часов она увеличилась в 2 раза по сравнению с контролем и продолжала расти, достигнув максимальных значений на третьи сутки.

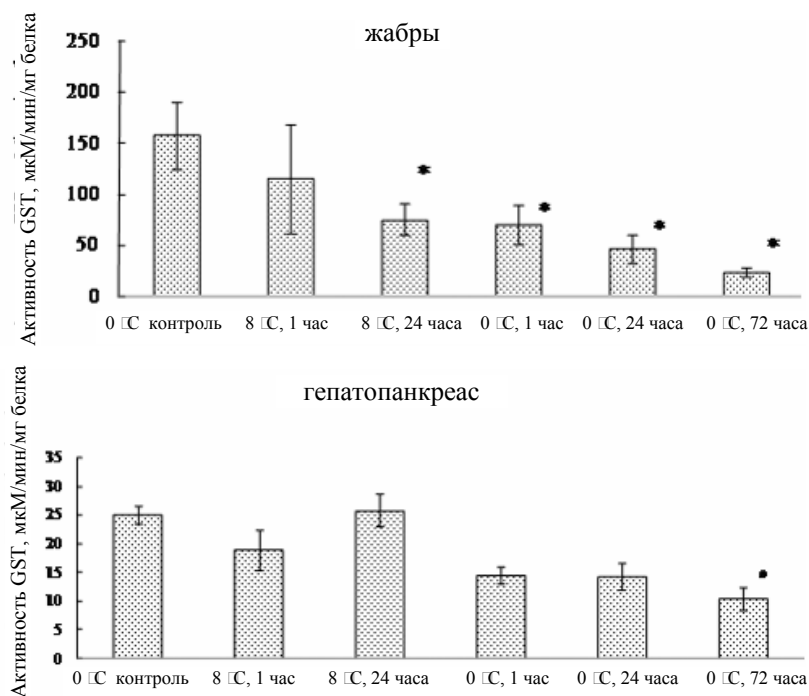


Рис. 2. Активность GST в жабрах и гепатопанкреасе мидий при термошоке

* – различия статистически значимы по сравнению с контрольной точкой ($p \leq 0,05$)

Активность GST в жабрах мидий (см. рис. 2) через час после начала теплового воздействия уменьшилась по сравнению с контролем, снижение продолжилось и через 24 часа. После стимуляции у моллюсков холодового шока падение активности фермента прекратилось, но через час активность GST снова начала снижаться и достигла минимальных значений к концу эксперимента.

В гепатопанкреасе общий тренд изменений активности был сходен с таковым в жабрах, тем не менее имелись некоторые отличия. Так, уровень активности фермента при тепловом шоке через час несколько снизился, а через сутки вернулся на исходный уровень. После возвращения мидий в условия исходного температурного режима началось падение активности фермента, которое продолжилось до конца эксперимента, но было менее выраженным, чем в жабрах.

При анализе полученных результатов необходимо иметь в виду, что для этого модельного эксперимента были использованы моллюски из сублиторальных популяций, адаптированные к среде с достаточно стабильным температурным режимом, то есть, по существу, – это stenotherмные организмы с узким диапазоном термотолерантности. У таких мидий резкое изменение условий обитания на 6–8 °C должно вызывать более сильный стресс по сравнению эвритермными особями из литоральных популяций.

Глутатион и глутатион S-трансфераза являются составной частью системы антиоксидантной защиты и биотрансформации ксенобиотиков, тем не менее их метаболические пути пересекаются в основном при детоксикации ферментом, использующим GSH как субстрат, нуклеофильных многоатомных соединений в фазе II, например, высоко цитотоксичного 4-гидрокси-2-ноненаля, продукта перекисного окисления липидов. Глутатион, как самостоятельная единица клеточной защиты, непосредственно участвует в перехвате разнообразных активных радикалов, в том числе АФК, поэтому тренд изменений исследованных показателей, несмотря на некоторые общие черты, имеет различия.

Показано, что у разных организмов реакция на температурный стресс на уровне количественных изменений GSH может различаться. Так, при холодовом стрессе концентрация GSH в бактериях *E. coli* снижается [Smirnova et al., 2001], а у крыс, эндотермных животных, напротив, растет [Dede et al., 2002; Yuksel et al., 2008]. При физической нагрузке в различных температурных режимах (+5 и +21 °C) у спортсменов, работающих в более холодных условиях, отмечено увеличение уровня GSH в эритроцитах [Hong et al., 2008]. Из-

вестно также, что GSH принимает участие в реакциях устойчивости растений к холодовому стрессу [Ohno и др., 1991; Kocsy et al., 2001]. Представляется вероятным, что вариабельность уровня глутатиона в тканях при колебаниях температуры окружающей среды может быть связана с изменением интенсивности окислительно-восстановительных процессов и, соответственно, с количеством АФК.

У исследованных мидий концентрация глутатиона в жабрах выше, чем в гепатопанкреасе, и по этому показателю ответная реакция на термошок была выражена сильнее. Интересно отметить, что как при тепловом, так и при холодовом воздействии уровень глутатиона в жабрах сначала возрастал, а потом возвращался к исходному значению в течение 24 и 48 часов соответственно. По-видимому, у мидий и, вероятно, у других двусторчатых моллюсков жаберный аппарат выполняет роль авангардного барьерного органа, осуществляющего активную биохимическую защиту в условиях активации окислительного стресса при воздействиях разного рода, и, следовательно, эволюционно приспособлен к более быстрой адаптации к изменившимся условиям среды обитания по сравнению с гепатопанкреасом. Тем не менее в условиях проведенного эксперимента более продолжительное разворачивание во времени ответной реакции в гепатопанкреасе стоит рассматривать как положительный и необходимый момент для организма, поскольку в этом органе происходит обезвреживание АФК, поступающих и из других органов, в том числе жабр.

Следует отметить, что все эти рассуждения касаются только изменений концентрации глутатиона, проявление активности GST имеет несколько иной характер. Воздействие на мидий последовательной резкой смены температуры привело к непрерывному снижению активности фермента в тканях, которое к концу эксперимента было в 2,5 (гепатопанкреас) – 6,6 (жабры) раза ниже, чем в контроле. Следствием термошока, по нашему мнению, могут быть нарушения в функционировании системы биотрансформации (фаза II), что может привести к развитию серьезных патологий в тканях и даже к гибели особи в результате накопления токсических продуктов, обычно нейтрализуемых GST при участии глутатиона [Fitzpatrick et al., 1995], из-за низкой активности этого фермента. Глутатион S-трансферазы косвенно участвуют в ликвидации последствий термошока и связанного с ним окислительного стресса через детоксикацию соединений, возникших в результате реакции с АФК, и не принимают прямого участия в адаптации беспозвоночных гидро-

бионтов к изменению температуры окружающей среды, как показано на черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* [Roméo et al., 2003; Bebianno et al., 2007] и некоторых видах рачков [Menezes et al., 2006]. Кроме того, у мидий обнаружена сезонная вариабельность активности этого фермента, ведущий вклад в которую вносит доступность пищи и насыщение воды кислородом, а не температура среды [Power, Sheehan, 1996; Sheehan, Power, 1999; Filho et al., 2001; Leinio, Lehtonen, 2005].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что резкая смена температуры вызывает у мидий определенные изменения в антиоксидантной системе на уровне GSH и GST. Количественные характеристики и вариабельность показателей имеют тканеспецифичную основу. Уровень GSH увеличивался, указывая на адаптивный характер изменений, тогда как активность GST постепенно снижалась в обоих органах, что, на наш взгляд, отражает патологическое действие резкой смены температуры на систему биотрансформации, которая теряет способность к адекватной детоксикации эндогенных перекисей, продуктов реакции соединений с АФК. Очевидно, что для сублиторальных мидий, обитающих в среде с достаточно стабильным термическим режимом водной среды, колебание температуры в рамках проведенного эксперимента, без сомнения, выходит за границы термотолерантности и является очень сильным стрессом, который может привести животных к гибели, причем вероятность этого события весьма высока.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ НШ–1410.2014.4, Программы фундаментальных исследований Президиума РАН на 2012–2014 гг. «Живая природа», проекта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг. (согл. № 8050).

Литература

- Бахмет И. Н. Оценка влияния нефтепродуктов на сердечный ритм мидий // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. Т. XXII, 2009. С. 267–277.
- Смирнов Л. П., Богдан В. В. Липиды в физиолого-биохимических адаптациях эктотермных организмов к абиотическим и биотическим факторам среды. М.: Наука, 2007. 182 с.
- Суховская И. В., Борвинская Е. В., Смирнов Л. П., Немов Н. Н. Сравнительный анализ методов определения концентрации белка – спектрофотометрии в диапазоне 200–220 нм и по Бредфорд // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2010. № 2. С. 68–71.
- Anestis A., Pörtner H. O., Lazou A., Michaelidis B. J. Metabolic and molecular stress responses of sublittoral bearded horse mussel *Modiolus barbatus* to warming sea water: implications for vertical zonation // Exp. Biol. 2008. Vol. 211. P. 2889–2898.
- Bebianno M. J., Lopes B., Guerra L., Hoarau P., Ferreira A. M. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors // Environment International. 2007. Vol. 33. P. 550–558.
- Cohn V. H., Lyle J. A. Fluorometric assay for glutathione // Analytical biochemistry. 1966. Vol. 14. P. 434–440.
- Dede S., Deger Y., Meral I. Effect of short-term hypothermia on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rats // J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med. 2002. Vol. 49, N 6. P. 286–288.
- Filho D. W., Torres M. A., Tribess T. B., Pedrosa R. C., Soares C. H. L. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*) // Braz. J. Med. Biol. Res. 2001. Vol. 34. P. 719–726.
- Fitzpatrick P. J., Krag T. O. B., Højrup P., Sheehan D. Characterization of a glutathione S-transferase and a related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel, *Mytilus edulis* // Biochem. J. 1995. Vol. 305. P. 145–150.
- Gonzalez F. J. Role of xenobiotic-metabolizing enzymes in cancer susceptibility: Keystone Symp. Mol. and Cell Biol. "Mol. Toxicol.", Copper Mountain, Colo, Jan. 9–15, 1995 // J. Cell. Biochem. 1995. Suppl. 19A. P. 187.
- Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249, N 22. P. 7130–7139.
- Hayes J. D., Strange R. C. Invited commentary potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress // Free Rad. Res. 1995. Vol. 22. N 3. P. 193–207.
- Hissin P. J., Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 74. P. 214–226.
- Hochachka P. V., Somero G. N. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. 2002. Oxford University Press, Oxford. 478 p.
- Hong J. H., Kim K. J., Suzuki K., Lee I. S. Effect of cold acclimation on antioxidant status in cold acclimated skaters // J. Physiol. Anthropol. 2008. Vol. 27, N 5. P. 255–262.
- Ivanina A. V., Cherkasov A. S., Sokolova I. M. Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin // J. Exp. Biol. 2008. Vol. 211. P. 577–586.
- Kaur M., Atif F., Ansari R. A., Ahmad F., Raisuddin S. The interactive effect of elevated temperature on deltamethrin-induced biochemical stress responses in *Channa punctata* Bloch. // Chem. Biol. Interact. 2011. Vol. 193, N 3. P. 216–224.
- Kocsy G., Galiba G., Brunold C. Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants // Physiologia Plantarum. 2001. Vol. 113. P. 158–164.

Leinio S., Lehtonen K. K. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea // Comp. Biochem. Physiol., Part C, Comp. Pharmacol. Toxicol. 2005. Vol. 140. P. 408–421.

Lesser M. P. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology // Annu. Rev. Physiol. 2006. Vol. 68. P. 253–278.

McCarthy M. P., Carroll D. L., Ringwood A. H. Tissue specific responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to silver nanoparticles // Aquat. Toxicol. 2013. Vol. 15. P. 138–139.

Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals // J. Biol. Chem. 1994. 269. P. 9397–9400.

Meister A., Anderson M. E. Glutathione // Ann. Rev. Biochem. 1983. Vol. 52. P. 711–760.

Menezes S., Soares A. M. V. M., Guilhermino L., Peck M. R. Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: Temperature, salinity and handling stress effects // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2006. Vol. 335. P. 114–122.

Noble J. E., Bailey M. J. A. Quantitation of proteins // Methods in enzymology. 2009. Vol. 463. P. 73–95.

Ohno H., Kondo T., Fujiwara Y., Tagami S., Kuroshima A., Kawakami Y. Effects of cold stress on glutathione and related enzymes in rat erythrocytes // Int. J. Biometeorol. 1991. Vol. 35, N 2. P. 111–113.

Power A., Sheehan D. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis* // Comp. Biochem. Physiol. 1996. Vol. 114. P. 99–103.

Roméo M., Hoarau P., Garello G., Gnassia-Barelli M., Girard J. P. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean // Environ. Pollut. 2003. Vol. 122. P. 369–378.

Sheehan D., Power A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defense mechanisms of bivalve mollusks // Comp. Biochem. Physiol., Part C, Comp. Pharmacol. Toxicol. 1999, Vol. 123. P. 193–199.

Smirnova G. V., Krasnykh T. A., Oktyabrsky O. N. Role of glutathione in the response of *Escherichia coli* to osmotic stress // Biochemistry (Mosc). 2001. Vol. 66. P. 973–978.

Trevisan R., Arl M., Sacchet C., Engel C., Danielli N. M., Mello D. F., Brocardo C., Maris A. F., Dafre A. L. Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity // Aquat. Toxicol. 2012. Vol. 108. P. 85–93.

Yuksel S., Asma D., Yesilada O. Antioxidative and metabolic responses to extended cold exposure in rats // Acta. Biol. Hung. 2008. Vol. 59, N 1. P. 57–66.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Суховская Ирина Викторовна

научный сотрудник лаб. экологической биохимии, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, Россия, 185910
эл. адрес: sukhovskaya@inbox.ru
тел.: 89052996049

Борвинская Екатерина Витальевна

научный сотрудник лаб. экологической биохимии, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, Россия, 185910
эл. адрес: katsu@inbox.ru

Бахмет Игорь Николаевич

старший научный сотрудник лаб. экологии рыб
и водных беспозвоночных, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, Россия, 185910
эл. адрес: igor.bakhmet@gmail.com

Немова Нина Николаевна

директор, член-корр. РАН, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, Россия, 185910
эл. адрес: nemova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 783615

Смирнов Лев Павлович

ведущий научный сотрудник лаб.
экологической биохимии, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, Россия, 185910
e-mail: levps@rambler.ru

Sukhovskaya, Irina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: sukhovskaya@inbox.ru
tel.: 89052996049

Borvinskaya, Ekaterina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: katsu@inbox.ru

Bakhmet, Igor

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: igor.bakhmet@gmail.com

Nemova, Nina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nemova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 783615

Smirnov, Lev

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: levps@rambler.ru

УДК: 577.115: 57.085.12: 597.552.512

КОНЦЕНТРАЦИЯ ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ В МЫШЦАХ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ *PARASALMO MYKISS* (WALBAUM, 1972) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПЕРИОДА ХРАНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПЕРЕД ЕГО ФИКСАЦИЕЙ

М. А. Назарова¹, О. Б. Васильева², П. О. Рипатти², Н. Н. Немова²

¹ Вологодский государственный университет

² Институт биологии Карельского научного центра РАН

Фиксирование мышц радужной форели для их последующего липидного анализа осуществляли после декапитации рыб в течение 12 часов через определенные промежутки времени. Концентрация большинства изученных компонентов не изменилась, за исключением жирнокислотного состава мышц радужной форели. Показано снижение содержания высоконенасыщенных длинноцепочечных жирных кислот. Наибольшие изменения в уровне изученных показателей установлены после 3 часов хранения биологического материала.

К л ю ч е в ы е с л о в а: липиды, жирные кислоты, хранение биологического материала, радужная форель.

M. A. Nazarova, O. B. Vasilyeva, P. O. Ripatti, N. N. Nemova. THE CONCENTRATION OF LIPID COMPONENTS IN THE MUSCLES OF RAINBOW TROUT *PARASALMO MYKISS* (WALBAUM, 1972) DEPENDING ON THE PRE-FIXATION PERIOD

Fixation of rainbow trout muscles for further lipid analysis was performed after decapitation of the fish within 12 hours at pre-defined time intervals. The concentration of most of the studied components has not changed, except for the fatty acid composition in the muscles of rainbow trout. A reduction in the content of highly unsaturated long-chain fatty acids is shown. The greatest changes in the studied parameters were detected after 3 hours of storage of the biological material.

Key words: lipids, fatty acids, storage of biological material, rainbow trout.

Введение

Успешное применение методов липидного анализа в эколого-биохимических исследованиях обусловлено широким информационным диапазоном липидных показателей, который дает возможность их использования для оценки адаптивных возможностей организма в

варьирующих условиях внешней среды [Аврова, 1998; Немова, Высоцкая, 2004; Биота..., 2012]. Сбор биологического материала в полевых условиях для последующего биохимического анализа имеет ряд сложностей, связанных прежде всего с достаточно длительным периодом времени, который затрачивается на предварительную пробоподготовку.

При хранении тканей и органов, полученных после декапитации животных, до момента их фиксации в органическом растворителе в них активируются процессы перекисидации и лизирования липидов, что влияет на конечный результат исследования [Timm-Heinrich et al., 2013]. Одним из способов минимизирования сроков первичной обработки биологического материала является его предварительная заморозка в жидком азоте с последующей фиксацией в органическом растворителе в условиях лаборатории [Christie, 1993]. Однако воздействие низких температур и последующее размораживание материала может снизить достоверность получаемых результатов, поскольку жирнокислотный состав тканей животных крайне чувствителен к изменению температур [Костецкий и др., 2008; Timm-Heinrich et al., 2013]. Учитывая вышесказанное, был проведен эксперимент с целью установления связи между уровнем липидных компонентов в мышцах радужной форели и временем, прошедшим с момента декапитации рыб до фиксации материала.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали радужную форель *Parasalmo mykiss* (Walbaum, 1792), культивируемую в форелевом хозяйстве, расположенном в северной части Ладожского озера. Выборка рыб (23 особи) была однородна по биологическим и морфометрическим характеристикам. Исследование проводилось на неполовозрелых самках в возрасте 1+.

В ходе работы у радужной форели отделяли белые скелетные мышцы, расположенные возле спинного плавника, и помещали их на хладагент. Часть ткани массой 0,4–0,5 г фиксировали в 5 мл смеси Фолча (хлороформ : метанол (2:1 по объему)) [Folch et al., 1957] в течение 5 минут после декапитации рыб. Оставшуюся часть филе форели помещали на хладагент и оставляли в холодильнике на 12 часов при температуре +5 °C. Через 1, 3, 6 и 12 часов после начала эксперимента проводили фиксацию образцов мышц форели аналогичным образом. Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609/EC).

Зафиксированные образцы мышц форели до анализа хранились при температуре +5 °C в течение 30 дней. Определяли содержание общих липидов; триацилглицеринов; холестерина;

эфиров холестерина; фосфолипидов; фосфатидилхолина; фосфатидилэтаноламина; фосфатидилинозитола; фосфатидилсерина; лизофосфатидилхолина; сфингомиелина; жирных кислот общих липидов: насыщенных, моновенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот.

Выделение общих липидов из зафиксированного материала проводили по методу Фолча [Folch et al., 1957]. Общие липиды разделяли методом тонкослойной хроматографии восходящим способом в системе растворителей: петролейный эфир : диэтиловый эфир : уксусная кислота (в соотношении 90:10:1 по объему) при комнатной температуре. Концентрацию липидов определяли стандартными спектрофотометрическими методами [Walsh et al., 1965; Engelbrecht et al., 1974; Сидоров и др., 1981]. Анализ отдельных фракций фосфолипидов был проведен с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в изократическом режиме на жидкостном хроматографе «Стайер» («Аквилон», Россия) [Arduini et al., 1996].

Для анализа жирных кислот общие липиды подвергались прямому метилированию [Цыганов, 1971]. Полученные метиловые эфиры ЖК разделяли на хроматографе «Кристалл 5000» («Хромотек», Россия). Идентификация и количественный анализ метиловых эфиров жирных кислот проводился путем расчета эквивалента длины цепи и сравнением его с табличными данными [Jamieson, 1975], а также с использованием стандартных растворов метиловых эфиров жирных кислот («Supelco») при помощи компьютерной программы по обработке хроматограмм «Хроматэк Аналитик». Статистическую обработку данных проводили общепринятыми статистическими методами [Елисеева, 2007; Коросов, Горбач, 2010].

Лабораторные исследования выполнены с использованием приборной базы центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Результаты и обсуждения

В результате проведенного анализа липидного состава мышц радужной форели установлено, что концентрация общих липидов (ОЛ) в течение всего периода эксперимента была примерно одинакова (табл. 1). Содержание данных компонентов составляло 16,8–17,5 % от сухой массы и соответствовало уровню ОЛ, установленному для рыб данного возраста и культивируемых в аналогичных условиях, что было показано в ранее проведенных исследованиях [Назарова и др., 2010, 2011]. Согласно

Таблица 1. Содержание общих липидов, фосфолипидов (в % сухой массы) в мышцах радужной форели

	Периоды фиксирования материала после декапитации рыб				
	5 минут	1 час	3 часа	6 часов	12 часов
Общие липиды	17,44	17,27	17,16	16,99	16,93
Фосфолипиды	5,63	5,57	5,46	5,40	5,41
Триацилглицерины	6,58	6,49	6,44	6,47	6,44
Эфиры холестерина	3,33	3,35	3,32	3,27	3,28
Холестерин	1,87	1,86	1,84	1,83	1,81
Фосфатидилинозитол	0,34	0,33	0,31	0,30	0,30
Фосфатидилсерин	0,11	0,11	0,11	0,09 ^{a,b}	0,07 ^{a,b}
Фосфатидилэтаноламин	1,41	1,40	1,40	1,41	1,40
Фосфатидилхолин	3,65	3,61	3,54	3,51 ^b	3,49 ^b
Лизофосфатидилхолин	0,055	0,057	0,059	0,072 ^b	0,076 ^b
Сфингомиелин	0,050	0,049	0,050	0,048	0,049
Неидентифицированные фосфолипиды	0,011	0,011	0,011	0,013 ^{a,b}	0,016 ^{a,b}

Примечание. а – различия достоверны при сравнении данных с предыдущей точкой, при $p \leq 0,05$; b – различия достоверны при сравнении данных с результатами, полученными при фиксации материала в течение 5 минут после декапитации рыб, при $p \leq 0,05$.

литературным источникам, содержание общих липидов в мышцах рыб при хранении на льду не изменяется в течение более чем двух недель [Choubert, Vassenaud, 2006; Widjaja et al., 2009]. Концентрация запасных липидов (триацилглицеринов и эфиров холестерина) в процессе хранения биологического материала была одинаковой ($p \leq 0,05$) (см. табл. 1), что имеет практическое значение при реализации радужной форели, поскольку от уровня данных липидных компонентов в филе зависит калорийность продукта. Содержание структурных компонентов – холестерина (ХС) и фосфолипидов (ФЛ) – влияет не только на органолептические свойства продукции форелеводов, но и на степень ее полезности [Tocher et al., 2008]. Данные соединения служат основными компонентами биомембран клеток, а также выполняют регуляторную, сигнальную, энергетическую и другие функции [Крепс, 1981; Tocher et al., 2008]. В ходе эксперимента обнаружена тенденция к снижению содержания ХС и ФЛ при хранении биологического материала, однако значимых различий не установлено. Среди индивидуальных фосфолипидов концентрация фосфатидилэтаноламина, фосфатидилинозитола и сфингомиелина в течение всего периода исследования была одинакова. Содержание других индивидуальных фосфолипидов в мышцах в процессе исследования менялось в разной степени. Установлено уменьшение концентрации фосфатидилхолина (ФХ) с течением времени. Снижение содержания фосфатидилсерина (ФС), по сравнению с ФХ, было менее выражено; достоверные различия в его уровне показаны через 3 часа после декапитации рыб. При дальнейшем хранении биологического материала изменение уровня ФС было более значительным. Одновременно со снижением содержания ФХ и ФС увеличивалась концентрация лизофосфатидилхолина и неидентифици-

рованных фосфолипидов, к которым относятся лизированные продукты минорных фосфолипидов, в том числе и лизофосфатидилсерин (см. табл. 1).

Наибольшим изменениям при хранении биологического материала подвергся жирнокислотный состав общих липидов. Абсолютное содержание изученных жирных кислот снижалось в течение всего периода исследования, при этом концентрация общих липидов оставалась прежней (см. табл. 1, 2). Уменьшение количества исследованных жирных кислот, вероятно, связано с их частичным окислением и накоплением жирных кислот с более короткой углеродной цепью. Таким образом, увеличивалась концентрация не идентифицированных в данной работе жирных кислот, к которым относятся кислоты, содержащие в своем составе менее четырнадцати углеродных атомов. Однако интенсивность снижения уровня жирных кислот была различна и зависела от их структуры. Показано уменьшение процентного содержания ряда жирных кислот, в основном относящихся к семейству $\omega 3$ полиненасыщенных жирных кислот (см. табл. 2). Наиболее значительное снижение установлено в содержании жирных кислот с большим количеством двойных связей, таких как докозагексаеновая 22:6 $\omega 3$, докозапентаеновая 22:5 $\omega 3$, эйкозапентаеновая 20:5 $\omega 3$ кислоты. Известно, что именно наличие ненасыщенных связей у жирных кислот способствует пероксидации липидов и образованию реакционно-активных радикалов [Ленинджер, 1985; Ким, 2002]. Концентрация насыщенных жирных кислот и ненасыщенных жирных кислот с меньшим количеством двойных связей (моноеновых) снижалась менее интенсивно, поэтому их доля от суммы жирных кислот не изменялась или незначительно возрастала в течение всего периода исследования (см. табл. 2).

Таблица 2. Содержание жирных кислот общих липидов (в % от суммы жирных кислот и в мг/г липида) в мышцах радужной форели

	Периоды фиксирования материала после декапитации рыб				
	5 минут	1 час	3 часа	6 часов	12 часов
14:00	<u>3.01*</u> 21,46	<u>2.95</u> 13,95 ^a	<u>2.98</u> 11,80 ^{a,b}	<u>2.90</u> 11,54 ^b	<u>2.90</u> 11,29 ^b
16:00	<u>14.77</u> 105,19	<u>15.05</u> 79,28 ^a	<u>14.02</u> 64,21 ^{a,b}	<u>14.41</u> 63,14 ^b	<u>14.20</u> 59,48 ^{a,b}
Сумма насыщенных ЖК	<u>22.47</u> 160,08	<u>22.76</u> 119,84 ^a	<u>21.99</u> 100,74 ^b	<u>22.31</u> 96,17 ^{a,b}	<u>22.28</u> 93,32 ^{a,b}
16:1ω7	<u>4.61</u> 32,86	<u>3.93^a</u> 20,72 ^a	<u>4.10^b</u> 18,80 ^b	<u>4.09^b</u> 18,32 ^b	<u>4.27^b</u> 17,88 ^b
18:1ω9	<u>23.94</u> 170,54	<u>25.51</u> 134,35 ^a	<u>28.44^{a,b}</u> 130,26 ^b	<u>28.71^b</u> 128,61 ^b	<u>29.03^b</u> 121,57 ^b
18:1ω7	<u>3.25</u> 23,16	<u>2.99</u> 15,74 ^a	<u>2.10^{a,b}</u> 9,62 ^{a,b}	<u>2.21^b</u> 9,12 ^{a,b}	<u>2.09^b</u> 8,73 ^{a,b}
20:1ω9	<u>3.43</u> 24,46	<u>3.20</u> 16,88 ^a	<u>2.97^b</u> 13,62 ^{a,b}	<u>3.13</u> 13,58 ^b	<u>3.22</u> 13,50 ^b
22:1ω11	<u>2.96</u> 21,12	<u>2.59</u> 13,63 ^a	<u>2.47</u> 11,31 ^{a,b}	<u>2.52</u> 10,97 ^b	<u>2.46</u> 10,32 ^b
Сумма моноеновых ЖК	<u>40.71</u> 289,99	<u>40.80</u> 214,86 ^a	<u>42.56^b</u> 194,93 ^{a,b}	<u>43.01^b</u> 188,72 ^{a,b}	<u>43.55^b</u> 182,40 ^b
16:3ω6	<u>0.20</u> 1,46	<u>0.22</u> 1,21 ^a	<u>0.26^b</u> 1,16 ^b	<u>0.25</u> 1,11 ^b	<u>0.25</u> 1,04 ^b
18:2ω6	<u>6.91</u> 49,26	<u>6.95</u> 36,58 ^a	<u>7.00</u> 32,08 ^{a,b}	<u>7.11</u> 31,54 ^b	<u>7.18</u> 30,08 ^b
20:4ω6	<u>0.55</u> 3,93	<u>0.59</u> 3,08 ^a	<u>0.55</u> 2,52 ^{a,b}	<u>0.55</u> 2,43 ^b	<u>0.57</u> 2,37 ^b
ω6 ПНЖК	<u>9.03</u> 64,30	<u>9.15</u> 48,18 ^a	<u>9.22</u> 42,23 ^{a,b}	<u>9.34</u> 41,23 ^b	<u>9.53^b</u> 39,90 ^b
ω9 ПНЖК	<u>0.23</u> 1,66	<u>0.24</u> 1,46	<u>0.26</u> 1,28 ^b	<u>0.26</u> 1,18 ^b	<u>0.27</u> 1,13 ^b
ω4 ПНЖК	<u>0.53</u> 5,08	<u>0.79^a</u> 4,97	<u>1.11^{a,b}</u> 4,88	<u>1.07^b</u> 4,66	<u>0.98^b</u> 4,12 ^b
18:3ω3	<u>2.10</u> 14,93	<u>2.01</u> 10,60 ^a	<u>1.90</u> 8,71 ^{a,b}	<u>1.83^b</u> 8,54 ^b	<u>1.90</u> 8,22 ^b
20:5ω3	<u>4.63</u> 32,99	<u>4.48</u> 23,61 ^a	<u>4.46</u> 20,42 ^{a,b}	<u>4.34</u> 18,97 ^b	<u>4.15^b</u> 17,37 ^{a,b}
22:5ω3	<u>1.36</u> 9,66	<u>1.33</u> 7,33 ^a	<u>1.30</u> 6,98 ^b	<u>1.27^b</u> 6,52 ^b	<u>1.27^b</u> 5,32 ^{a,b}
22:6ω3	<u>17.16</u> 122,26	<u>16.95</u> 89,24 ^a	<u>15.46^{a,b}</u> 70,80 ^{a,b}	<u>14.99^b</u> 65,13 ^{a,b}	<u>14.47^b</u> 60,60 ^{a,b}
ω3 ПНЖК	<u>27.03</u> 192,54	<u>26.32</u> 138,59 ^a	<u>24.86^{a,b}</u> 113,89 ^{a,b}	<u>24.00^b</u> 100,24 ^b	<u>23.38^b</u> 97,90 ^b
Сумма ПНЖК	<u>36.82</u> 262,28	<u>36.46</u> 192,01 ^a	<u>35.45</u> 162,39 ^{a,b}	<u>34.92^b</u> 153,67 ^{a,b}	<u>34.16^b</u> 143,06 ^{a,b}

Примечание. * – в числителе приведены данные в % от суммы жирных кислот, в знаменателе – в мг/г липида; а – различия достоверны при сравнении данных с предыдущей точкой, при $p \leq 0,05$; b – различия достоверны при сравнении данных с результатами, полученными при фиксации материала в течение 5 минут после декапитации рыб, при $p \leq 0,05$.

Таким образом, фиксацию биологического материала в полевых условиях проведения работ необходимо осуществлять за минимально короткий период времени после декапитации рыб, с целью получения наиболее достоверных результатов. Если период хранения тканей и органов до фиксирования проб составляет более трех часов, то при интерпретации результатов содержания жирных кислот в тканях рыб следует использовать их относительные единицы. Уровень других липидных показателей менялся незначительно.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект 13-04-90714-мол-рф-

нр, и программы Президента РФ для господдержки ведущих научных школ РФ НШ – 1642.2012.4.

Литература

Аврова Н. Ф. Биохимические механизмы акклимации к изменяющимся условиям среды у позвоночных: роль липидов // Ж. эвол. биохим. и физиол. 1998. Т. 34, № 3. С. 170–180.

Биота северных озер в условиях антропогенного воздействия / Ред. Н. Н. Немова, Н. В. Ильмаст, Е. П. Иешко, О. В. Мещерякова. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2012. 230 с.

Елисеева И. И. Статистика. М.: Высшее образование, 2007. 566 с.

Ким А. М. Органическая химия: учеб. пособие. 3-е изд., испр. и доп. Новосибирск: Сиб. ун-в. изд-во, 2002. 971 с.

Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных: метод. пособие. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2010. 84 с.

Костецкий Э. Я., Борода А. В., Одинцова Н. А. Изменения липидного состава эмбриональных клеток мидий *Mytilus trossulus* в процессе криоконсервации // Биофизика. 2008. Т. 53, вып. 4. С. 658–665.

Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука, 1981. 339 с.

Ленинджер А. Основы биохимии в 3-х т. Т. 1. / Пер. с англ. М.: Мир, 1985. 367 с.

Назарова М. А., Васильева О. Б., Немова Н. Н. Сравнительный анализ общих липидов состава корма и тканей радужной форели *Oncorhynchus mykiss* W. // Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб: тезисы докл. междунар. конф. СПб.: Нестор-История, 2010. С. 136–138.

Назарова М. А., Васильева О. Б., Руоколайнен Т. Р., Шатуновский М. И., Немова Н. Н. Влияние некоторых факторов на липидные показатели тканей радужной форели (*Parasalmo mikiss* Walb.) // Экологические проблемы пресноводных рыбохозяйственных водоемов России. Всероссийская конференция с международным участием, Казань, 18–20 октября 2011 г. СПб: ГосНИОРХ, 2011. С. 265–270.

Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 215 с.

Сидоров В. С. Экологическая биохимия рыб. Липиды. Л.: Наука, 1983. 240 с.

Сидоров В. С., Лизенко Е. И., Болгова О. М. Методы выделения, тонкослойная и газожидкостная хроматография липидов рыб // Типовые методики исследования продуктивных видов рыб в пределах их ареалов. 1981. Ч. IV. С. 58–69.

Цыганов Э. П. Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагеля // Лабораторное дело. 1971. № 8. С. 490–493.

Arduini A., Pescechera A., Dottori S. High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies // J. Lipid Res. 1996. Vol. 37, N 2. P. 684–689.

Choubert G., Baccaunaud M. Colour changes of fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) fed astaxanthin or canthaxanthin during storage under controlled or modified atmosphere // LWT – Food Science and Technology. 2006. Vol. 39, N 10. P. 1203–1213.

Christie W. W. Preparation of lipid extracts from tissues // Advances in Lipid Methodology. 1993. P. 195–213.

Engelbrecht F. M., Mari F., Anderson J. T. Cholesterol determination in serum. A rapid direction method // Med. J. 1974. Vol. 48, N 7. P. 250–356.

Folch J., Lees M., Stanley G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497–509.

Jamieson G. R. GLS-identification techniques for longchain unsaturated fatty acids / G. R. Jamieson // J. Chromatogr. Sci. 1975. Vol. 13, N 10. P. 491–497.

Timm-Heinrich M., Eymard S., Baron C. P., Nielsen H. H., Jacobsen C. Oxidative changes during ice storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed different ratios of marine and vegetable feed ingredients // Food Chemistry. 2013. Vol. 136, N 3–4. P. 1220–1230.

Tocher D. R., Bendiksen E. A., Campbell P. J., Bell J. G. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish // Aquaculture, 2008. Vol. 280. P. 21–34.

Walsh D. E., Banasik O. J., Gilles K. A. Thin-layer chromatographic separation and colorimetric analysis of barley or malt lipid classis and their fatty acids // J. Chromat. 1965. Vol. 17, N 2. P. 278–287.

Widjaja W. P., Abdulmir A. S., Abu Bakar F. B., Saari N. B., Ishak Z. B., Hamid A. A. Lipid quality deterioration of bagridae catfish (*Mystus nemurus*) during storage // Research Journal of Biological Sciences. 2009. Vol. 4, N 4. P. 525–530.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Назарова Марина Александровна

старший преподаватель кафедры химии
Вологодский государственный университет
ул. Ленина, 15, Вологда, Россия, 160035
эл. адрес: marinamarina35@yandex.ru
тел.: (8172) 725201

Васильева Ольга Борисовна

старший научный сотрудник лаб. экологической биохимии,
к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: vasil@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Рипатти Паули Онниевич

ведущий научный сотрудник лаб. экологической биохимии,
к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Карелия,
Россия, 185910
тел.: (8142) 769810

Nazarova, Marina

Vologda State University,
15 Lenina St., 160035 Vologda, Russia
e-mail: marinamarina35@yandex.ru
tel.: (8172) 725201

Vasilyeva, Olga

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: vasil@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

Ripatti, Pauli

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
tel.: (8142) 769810

Немова Нина Николаевна

директор, главный научный сотрудник лаб. экологической биохимии, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810, 783615

Nemova, Nina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nemova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810, 783615

УДК 581.1

РЕАКЦИЯ УСТЬИЧНОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ НА ДЕЙСТВИЕ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ЕЖЕСУТОЧНЫХ СНИЖЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ЗАРАЖЕНИЕ ФИТОПАРАЗИТИЧЕСКОЙ НЕМАТОДОЙ

В. В. Лаврова, Е. Н. Икконен, Е. М. Матвеева, М. И. Сысоева

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучено влияние предобработки кратковременными ежесуточными снижениями температуры (ДРОП) на устьичную проводимость листьев растений картофеля, зараженных фитопаразитической нематодой. Зараженные растения характеризуются низкой устьичной проводимостью и транспирацией листьев. Предобработка растений картофеля кратковременными ежесуточными снижениями температуры способствует поддержанию работы устьичного аппарата в условиях заражения фитопаразитической нематодой, что свидетельствует о снижении негативных последствий нематодной инвазии на растительный организм.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Solanum tuberosum* L., картофельная цистообразующая нематода, кратковременные ежесуточные снижения температуры, устьичная проводимость.

V. V. Lavrova, E. N. Ikkonen, E. M. Matveeva, M. I. Sysoeva. THE RESPONSE OF THE STOMATAL APPARATUS OF POTATO PLANTS TO DAILY SHORT-TERM TEMPERATURE DROPS AND NEMATODE INFESTATION

The effects of daily short-term temperature drops (DROP) on the stomatal conductance in the leaves of nematode-infected potato plants have been studied. Nematode-infected plants are characterized by low stomatal conductance and transpiration of leaves. Pretreatment of potato plants by daily short-term temperature drops helped maintain the performance of the stomatal apparatus during nematode invasion, indicating an alleviation of the negative effects of nematode infection on the plants.

K e y w o r d s: *Solanum tuberosum* L., potato cyst nematode, short-term temperature drop, stomatal conductance.

Введение

Картофельная цистообразующая нематода (КЦН) является облигатным седентарным эндопаразитом корневой системы картофеля, который для прохождения жизненного цикла формирует в растительной ткани специализированные

места питания (синцитий), сильно изменяя метаболизм растения-хозяина. КЦН принадлежит к числу наиболее серьезных и экономически важных вредителей и внесен в международный список карантинных организмов. В настоящее время в Российской Федерации распространен только один вид КЦН – *Globodera rostochiensis*

Woll. [Subbotin et al., 2000]. Паразитирование нематоды в корнях оказывает негативное влияние на многие физиологические процессы растений [Соловьева и др., 1989].

Устьичный аппарат занимает важное место в регуляции водного баланса и газообмена растений. Известно, что при заражении грибами и вирусными инфекциями устьица закрываются, и это ведет к нарушению водного режима, а соответственно, к снижению жизнедеятельности и продуктивности растений [Соловьева и др., 1989]. Важная роль в регуляции движения устьиц и транспирации принадлежит температуре. Ранее проведенные исследования показали, что кратковременные ежесуточные снижения температуры (ДРОП, от англ. drop – «падение»), широко распространенные в природе, повышают устойчивость растений картофеля к нематоде [Сысоева и др., 2011]. Особое внимание уделено изучению фотосинтетического аппарата (ФСА) растений. К настоящему времени изучено действие кратковременных ежесуточных снижений температуры на функциональное состояние ФСА [Сысоева и др., 2010] и содержание фотосинтетических пигментов в условиях заражения [Сысоева и др., 2013]. Однако не исследовано влияние ДРОП на функционирование устьичного аппарата растений картофеля при заражении нематодой, что и явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы

Мини-клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L., с. Невский – восприимчивый к КЦН), полученные в ГНУ «Карельская ГСХОС Россельхозакадемии», проращивали стандартным способом на свету в течение 3 недель, высаживали в пластиковые сосуды с песком при поливе питательным раствором с добавлением микроэлементов (рН 5,5–5,6) и выращивали в камере искусственного климата при температуре 23 °С, фотопериоде (день/ночь) 16/8 ч и освещенности 10 клк. По достижении фазы трех листьев часть растений оставляли при 23 °С (контрольные растения), а остальные подвергали в течение 6 суток ежесуточным снижениям температуры (с 23 до 5 °С) на 2 ч в конце ночного периода (ДРОП-обработанные растения). Сразу после завершения температурных обработок (0-е сутки) проводили измерение устьичной проводимости, транспирации листьев, содержания CO₂ в межклеточном пространстве на 3-м полностью развернувшемся листе наиболее развитого побега растений каждого варианта (контрольные растения, ДРОП-обработанные растения).

На следующий день все растения заражали нематодой (*Globodera rostochiensis* Woll. патотип Ro1, доза – 10 цист/растение) и далее выращивали в оптимальных условиях (температура 23 °С, фотопериод (день/ночь) 16/8 ч, освещенность 10 клк). Устьичную проводимость, транспирацию листьев и содержание CO₂ в межклеточном пространстве измеряли в период, когда нематода оказывает существенное влияние на физиологические процессы растений (20-е сутки после заражения; контрольные растения + заражение, ДРОП-обработанные растения + заражение). Все измерения проводили на 3-м полностью развернувшемся листе наиболее развитого побега.

Устьичную проводимость, транспирацию листьев и содержание CO₂ в межклеточном пространстве измеряли при помощи портативной фотосинтетической системы HCM-1000 (Walz, Германия) при освещенности 1000 мкмоль/(м²·с) фотосинтетически активной радиации, влажности воздуха 60–70 %, содержании CO₂ в воздухе 400 ppm, температуре 21 °С.

В таблицах приведены средние арифметические значения из двух независимых опытов по пяти повторностям и их стандартные ошибки. Достоверность различий между средними оценивали с помощью критерия Стьюдента (при $p \leq 0,05$) с использованием дисперсионного анализа в пакете программ Statistica (v.8.0.550.0, StatSoft, Inc). Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИБ КарНЦ РАН.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного исследования для растений картофеля установлены следующие параметры функционирования устьичного аппарата: устьичная проводимость – 122 ммоль H₂O/м²·с, транспирация листьев – 2,0 ммоль H₂O/м²·с, содержание CO₂ в межклеточном пространстве – 261 ppm (табл. 1). Обработка растений кратковременными ежесуточными снижениями температуры вызвала повышение устьичной проводимости и транспирации листьев на 54 и 60 % соответственно (см. табл. 1). Подобная закономерность была отмечена для растений огурца [Икконен и др., 2012] и, вероятно, обусловлена перераспределением содержания абсцизовой кислоты в растении при низкотемпературном воздействии [Kudoyarova et al., 2011].

Исследование функционирования устьичного аппарата зараженных растений проводилось на эндодермальном этапе развития паразита, когда проникшие в корни растений инвазионные личинки нематоды из состояния личинки 2-го возраста (J2) проходят развитие до состояния

личинки 4-го возраста (J4). Это период активно-го питания нематоды за счет метаболитов и энергии хозяина, в течение которого паразит оказывает наибольшее влияние на физиологические процессы растения [Матвеева и др., 2007]. Зараженные нематодой растения характеризовались довольно низкой устьичной проводимостью и транспирацией (табл. 2), что согласуется с результатами исследований, полученных ранее для паразитарных систем «картофель – *Globodera pallida*» и «соевые бобы – *Heterodera glycines*» [Fatemy et al., 1985; Schans, Arntzen, 1991; Asmus, Ferraz, 2002]. Такая реакция устьичного аппарата может быть вызвана особенностями развития паразита на данном этапе и его влиянием на растительный организм. Формирование в тканях корня гипертрофированного многоклеточного комплекса (синцития) приводит к анатомическим изменениям корней и сопровождается нарушением их поглотительной функции, нарушением водного режима растений [Fatemy et al., 1985; Соловьева и др., 1989]. Частичное закрытие устьиц и связанное с ним падение устьичной проводимости, возможно, стало одной из причин снижения уровня CO_2 в межклеточном пространстве (см. табл. 2). На основании полученных данных можно предположить негативное влияние заражения на интенсивность фотосинтеза как интегрального показателя жизнеспособности и продуктивности растений, что подтверждается данными по снижению качественных и количественных характеристик урожая картофеля в условиях заражения почвы нематодой [Лаврова, 2012].

Таблица 1. Устьичная проводимость (g_s), транспирация (Tr), содержание CO_2 в межклеточном пространстве (C_i) листьев контрольных и ДРОП-обработанных растений картофеля после температурных обработок (0-е сутки)

Параметры	g_s , ммоль H_2O / ($\text{м}^2 \cdot \text{с}$)	Tr , ммоль H_2O / ($\text{м}^2 \cdot \text{с}$)	C_i , ppm
контрольные растения	$122,0 \pm 16$	$2,0 \pm 0,3$	$261,0 \pm 11$
ДРОП-обработанные растения	$188,0 \pm 25$	$3,2 \pm 0,5$	$261,0 \pm 19$

Таблица 2. Устьичная проводимость (g_s), транспирация (Tr), содержание CO_2 в межклеточном пространстве (C_i) листьев контрольных и ДРОП-обработанных растений картофеля при заражении нематодой (20-е сутки)

Параметры	g_s , ммоль H_2O / ($\text{м}^2 \cdot \text{с}$)	Tr , ммоль H_2O / ($\text{м}^2 \cdot \text{с}$)	C_i , ppm
контрольные растения + заражение	$45,0 \pm 10$	$1,2 \pm 0,2$	$90,0 \pm 11$
ДРОП-обработанные растения + заражение	$68,0 \pm 11$	$1,7 \pm 0,2$	$193,0 \pm 12$

Предобработка растений кратковременными ежесуточными снижениями температуры способствовала поддержанию устьичной проводимости и транспирации листьев при заражении растений нематодой (см. табл. 2). Можно предположить, что ДРОП-предобработка позволяет сбалансировать приток воды и ее испарение, позволяя устьицам оставаться открытыми и обеспечивать оптимальный газообмен и фотосинтез растений. Ранее проведенные исследования показали эффективность такой низкотемпературной предобработки для повышения продуктивности растений в условиях заражения и снижения популяции паразита [Лаврова и др., 2014], что связано с повышением устойчивости растений и было подтверждено данными по экспрессии гена *H1*, ответственного за реакцию сверхчувствительности [Сысоева и др., 2011].

Таким образом, предобработка растений картофеля кратковременными ежесуточными снижениями температуры способствует поддержанию работы устьичного аппарата в условиях заражения фитопаразитической нематодой, что свидетельствует о снижении негативных последствий нематодной инвазии на растительный организм.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биоресурсы 2012–2014» (№ г. р. 01201262103) и РФФИ (№ 14-04-00840а).

Литература

- Икконен Е. Н., Шибеева Т. Г., Сысоева М. И., Шерудио Е. Г. Устьичная проводимость *Cucumis sativus* L. при длительном и кратковременном действии низких температур // Физиология растений. 2012. Т. 59, № 5. С. 716–720.
- Лаврова В. В. Реакция растений картофеля на кратковременные низкотемпературные обработки при заражении нематодой: физиолого-биохимический аспект: автореф. дис. ... канд. биол. наук. 2012. 22 с.
- Лаврова В. В., Матвеева Е. М., Сысоева М. И. Предпосадочная обработка клубней картофеля кратковременными снижениями температуры в условиях заражения картофельной цистообразующей нематодой // Сельскохозяйственная биология. 2014 (в печати).
- Матвеева Е. М., Иешко Е. П., Сысоева М. И., Шерудио Е. Г. Температуруообусловленные реакции паразито-хозяинных отношений в системе «картофель – картофельная цистообразующая нематода» // Нематоды естественных и трансформированных экосистем. Петрозаводск, 2007. С. 62–65.
- Соловьева Г. И., Потаевич Е. В., Богданова А. П., Макарычева И. В., Коваленко Т. Е. Физиология глобдерорезистентности картофеля. Л.: Наука, 1989. 134 с.

Сысоева М. И., Лаврова В. В., Марковская Е. Ф., Матвеева Е. М., Шерудило Е. Г. Влияние ежесуточных кратковременных снижений температуры на состояние фотосинтетического аппарата растений картофеля в условиях заражения фитопаразитической нематодой // Труды КарНЦ РАН. 2010. № 2. С. 41–46.

Сысоева М. И., Лаврова В. В., Марковская Е. Ф., Матвеева Е. М., Шерудило Е. Г., Топчиева Л. В. Кросс-адаптация растений картофеля к действию низких температур и заражению картофельной цистообразующей нематодой // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 6. С. 853–858.

Сысоева М. И., Лаврова В. В., Матвеева Е. М. Влияние кратковременных ежесуточных снижений температуры на содержание фотосинтетических пигментов в листьях зараженного нематодой картофеля // Труды КарНЦ РАН. 2013. № 3. С. 194–199.

Asmus G. L., Ferraz L. C. Effect of population densities of *Heterodera glycines* race 3 on leaf area, photosynthesis and yield of soybean // Fitopatologia Brasileira. 2002. Vol. 27, N 3. P. 273–278.

Kudoyarova G., Veselova S., Hartung W., Farhutdinov R., Veselov D., Sharipova G. Involvement of Root ABA and Hydraulic Conductivity in the Control of Water Relations in Wheat Plants Exposed to Increased Evaporative Demand // Planta. 2011. Vol. 233. P. 87–94.

Fatemy F., Trinder P. K. E., Wingfield J. N., Evans K. Effects of *Globodera rostochiensis*, water stress and exogenous abscisic acid on stomatal function and water use of Cara and Pentland Dell potato plants // Revue Nematol. 1985. Vol. 8, N 3. P. 249–255.

Schans J., Arntzen F. K. Photosynthesis, transpiration and plant growth characters of different potato cultivars at various densities of *Globodera pallida* // Neth. J. Pl. Path. 1991. Vol. 97. P. 297–310.

Subbotin S. A., Halford P. D., Warry A., Perry R. N. Variations in ribosomal DNA sequences and phylogeny of *Globodera* parasiting solanaceous plants // Nematology. 2000. Vol. 2, N 6. P. 591–604.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лаврова Виктория Витальевна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: VVLavrova@mail.ru
тел.: (8142) 762706

Lavrova, Victoria

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: VVLavrova@mail.ru
tel.: (8142) 762706

Икконен Елена Николаевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ikkonen@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Ikkonen, Elena

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ikkonen@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Матвеева Елизавета Михайловна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: matveeva@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Matveeva, Elizaveta

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: matveeva@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Сысоева Марина Ивановна

главный научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910

Syssoeva, Marina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia

УДК 577.152.321:597.554.3:[504.5:628.3](470.22)

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННЫХ ВОД КОСТОМУКШСКОГО ГОРНО-ОБОГАТИТЕЛЬНОГО КОМБИНАТА НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПЛОТВЫ

Е. А. Вдовиченко, Р. У. Высоцкая

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Исследована активность лизосомальных ферментов (β -глюкозидазы, β -галактозидазы, ДНКазы, РНКазы, кислой фосфатазы) в органах плотвы *Rutilus rutilus* L. из чистого озера (оз. Каменное) и двух водоемов озерно-речной системы Кенти – Кенто, принимающей техногенные воды горно-обогатительного комбината (ОАО «Карельский окатыш»). У рыб из верхнего озера (оз. Костомукшского, преобразованного в хвостохранилище комбината) и нижнего (оз. Койвас, отличающегося кратностью разбавления техногенных вод) выявлены существенные сдвиги в активности ферментов. Показано, что активность кислой фосфатазы и нуклеаз в печени и жабрах у рыб из хвостохранилища выше, чем у особей из оз. Койвас, что служит косвенным показателем усиления биосинтетических процессов и мобилизации защитных сил организма. Отмечено адаптивное повышение уровня активности β -глюкозидазы, свидетельствующее о вовлечении содержащих глюкозу компонентов в процессы анаэробного обеспечения организма рыб энергией в условиях минерального загрязнения водоемов. Обсуждается зависимость ответных биохимических реакций рыб от состава и интенсивности загрязнения вод отходами железорудного производства.

К л ю ч е в ы е с л о в а: лизосомальные гликозидазы, лизосомальные нуклеазы, кислая фосфатаза, биохимическая адаптация, минеральное загрязнение, плотва.

E. A. Vdovichenko, R. U. Vysotskaya. THE EFFECT OF WASTEWATER FROM THE KOSTOMUKSHA IRON-ORE MINING AND CONCENTRATION MILL ON LYSOSOMAL ENZYME ACTIVITY IN ROACH

The activity of lysosomal enzymes (β -glucosidase, β -galactosidase, DNase, RNase, acid phosphatase) in the organs of roach *Rutilus rutilus* L., inhabiting a pure lake (Lake Kamennoe) and two reservoirs of the lake-river system Kenti – Kento, receiving ore mining and processing wastewater (from "Karelskiy Okatysh" mill), was investigated. Significant changes in the enzymatic activity between fish from the upstream lake (Kostomukshskoe, converted into a tailings dump) and the downstream lake (Koivas, with the wastewater far more diluted) were revealed. It was shown that the activity of acid phosphatase and nucleases in the liver and gills of roach inhabiting the tailings dump was higher than the activity of these enzymes in fish from Lake Koivas, which can be an indirect indicator of biosynthetic processes intensification and mobilization of defense mechanisms in organisms. The adaptive increase in β -glucosidase activity was marked. It indicates the involvement of glucose-containing components in the anaerobic processes of energy supply to an organism under the influence of mineral pollution. The dependence of biochemical responses in fish on the composition and intensity of water pollution by ore mining and processing wastewater is discussed.

Введение

Поверхностные воды суши наиболее подвержены загрязнению, поскольку являются конечными накопителями различных загрязняющих компонентов, поступающих с речным стоком и переносимых воздушным путем в региональном и глобальном масштабах [Моисеенко, 2009]. Для своевременного выявления и прогноза развития негативных процессов, определяющих качество вод, разработки мер по предотвращению этих процессов проводится мониторинг водных объектов. Значительной трансформации подвергаются водные экосистемы, расположенные в регионах с развитой горнодобывающей и перерабатывающей промышленностью [Кашулин и др., 1999]. На севере Карелии таким объектом, испытывающим значительную антропогенную нагрузку, является озерно-речная система Кенти–Кенто. Основной источник воздействия на нее – техногенные воды Костомукшского горно-обогатительного комбината (ГОК) по добыче и обогащению железорудного сырья [Лозовик и др., 2003]. Верхнее озеро системы (оз. Костомукшское) преобразовано в хвостохранилище и используется для хранения отходов производства (хвостов) и для оборотного водоснабжения предприятия. Воды хвостохранилища отличаются высокой минерализацией с преобладанием ионов калия, сульфатов и гидрокарбонатов, щелочным значением pH и наличием мелкодисперсной взвеси размолотой горной породы (табл.). Профильтовавшиеся через дамбу, отделяющую хвостохранилище от десяти нижележащих озер системы, и попадающие в результате ежегодных попусков по отводным каналам техногенные воды комбината оказывают влияние на всю экосистему р. Кенти. По результатам гидрохимических исследований, в нижних озерах соотношение основных ионов в воде такое же, как и в вышерасположенных, но их концентрации существенно отличаются. Так, в оз. Койвас кратность разбавления техногенных вод равна 3, в Ломозере – 5, а в оз. Среднее Куйто, куда впадает р. Кенти, – 40 [Состояние..., 2007]. Ионный состав воды в оз. Среднее Куйто практически соответствует природному с повышенной долей калия и сульфатов.

Гидрохимическая характеристика водоемов [Состояние..., 2007]

	Каменное	Койвас	хвостохранилище
Общая минерализация, мг/л	11,3	351,0	757,0
pH	5,8–6,9	7,0–7,5	8,0–8,5
K ⁺ мг/л	0,3	32,1	146,1
Na ⁺ мг/л	1	4,6	14,8
SO ₄ ²⁻ мг/л	1,9	57,1	172,4
HCO ₃ ⁻ мг/л	1,2	48,2	147,3
Cl ⁻ мг/л	0,8	2,4	7

При проведении биомониторинга и тестирования водных объектов в настоящее время применяют как традиционные биологические, так и физиолого-биохимические и молекулярно-генетические методы [Сидоров и др., 2003; Немова, Высоцкая, 2004; Морозов, Высоцкая, 2007; Мещерякова и др., 2010]. В качестве объектов исследования используют рыб, поскольку они часто являются конечными звеньями трофических цепей водных экосистем, что позволяет получить полную картину изменений, произошедших на всех предыдущих уровнях [Кашулин и др., 1999]. В проведенных ранее исследованиях было показано, что на клеточном уровне высокую чувствительность к промышленным поллютантам проявляют особые внутриклеточные органеллы – лизосомы [Versteeg, Giesy, 1985; Köhler, 1991; Baba et al., 1997; Высоцкая, Немова, 2008]. Широкий комплекс лизосомальных гидролаз активно участвует в адаптивных перестройках организма гидробионтов к меняющимся условиям среды, в том числе к ее минеральному составу [Немова, Высоцкая, 2004; Такшеев, 2005; Вдовиченко, Высоцкая, 2012; Биота..., 2012]. Данная работа продолжает этот ряд наблюдений. Целью настоящего исследования являлось изучение активности лизосомальных ферментов у рыб, обитающих в водоемах озерно-речной системы р. Кенти, в разной степени подвергающихся трансформации под влиянием техногенных вод Костомукшского ГОК.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования была выбрана плотва *Rutilus rutilus* L. – типичный представитель массовых видов рыб Костомукшского хвостохранилища и нижележащего озера Койвас. Для сравнения были взяты

рыбы того же вида из чистого озера Каменное, расположенного на территории заповедника «Костомукшский» и не подвергающегося антропогенному воздействию. На момент исследований минерализация воды в оз. Каменное составляла 11,5–24,1 мг/л, по ионному составу она относится к гидрокарбонатно-кальциевому типу, имеет слабокислую реакцию (рН 5,8–6,9) [Биота..., 2012]. Взятые для биохимического анализа рыбы имели следующие характеристики: самки плотвы из хвостохранилища были четвертой стадии зрелости гонад, возраста 4–5 лет; из оз. Каменное и оз. Койвас – второй стадии зрелости гонад, возраста 8–9 лет.

Органы рыб (печень, гонады, жабры, мышцы) извлекали сразу же после вылова и хранили при температуре –80 °С до начала анализа. 10%-е гомогенаты готовили на 0,25 М растворе сахарозы с добавлением ЭДТА и неионного детергента – 0,1%-го раствора тритона X-100, затем центрифугировали при 10 000 g и температуре +4 °С в течение 30 мин. В полученном супернатанте определяли активность лизосомальных ферментов и содержание белка.

Активность лизосомальных гликозидаз – β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) и β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23) определяли по методам А. А. Покровского и др. [1971] и Баррета и Хита [1980]. В качестве субстратов использовали растворы п-нитрофенил- β ,D-глюкопиранозиды и п-нитрофенил- β ,D-галактопиранозиды на цитратном буфере (рН 5,0 и 4,0, соответствующий рН оптимуму исследованных ферментов). Активность обеих гликозидаз выражали в микромолях п-нитрофенола, освобожденного в условиях реакции за единицу времени.

Определение активности кислых нуклеаз – РНКазы (КФ 3.1.4.23) и ДНКазы (КФ 3.1.4.6) проводили по методам А. П. Левицкого и др. [1973] и А. А. Покровского с соавт. [Покровский, Арчаков, 1968]. В качестве субстратов использовали 0,1%-е растворы РНК и ДНК на ацетатном буфере (рН 5,2 и 5,0 соответственно). Активность ферментов выражали в условных единицах D_{260}° .

Активность кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2) определяли по методу Баррета и Хита [1980]. Субстратом служил 1%-й раствор β -глицерофосфата натрия на ацетатном буфере (рН 4,8). Активность фермента выражали в микрограммах фосфора неорганического [Kahovcova, Odavic, 1969], освобожденного в условиях реакции за единицу времени. Расчет активности ферментов производили на 1 г сырого веса

ткани в минуту и на 1 мг белка. Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури [Биохимические методы..., 1969].

Полученные результаты обрабатывали общепринятыми методами статистики, оценивая достоверность различий по непараметрическому критерию U Вилкоксона–Манна–Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$ [Гублер, Генкин, 1969].

Результаты

О степени участия лизосомального аппарата в адаптивных реакциях плотвы к минеральному загрязнению можно судить по данным, представленным на рисунке 1. В печени, жабрах и мышцах активность кислой фосфатазы – фермента-маркера лизосом у рыб из оз. Койвас, была ниже, чем у рыб из хвостохранилища. Следует указать, что в обоих водоемах, загрязняемых техногенными водами железорудного производства, активность кислой фосфатазы была значительно ниже, чем у рыб из чистого озера.

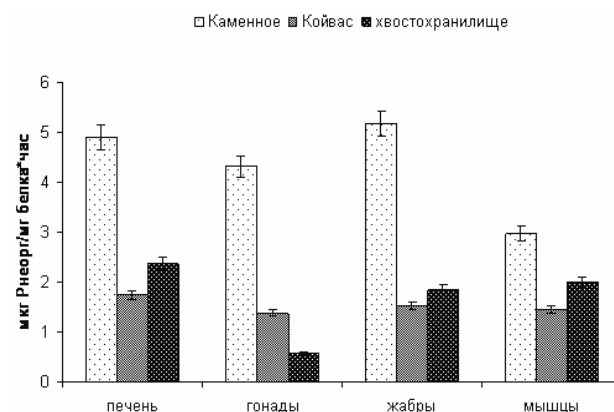


Рис. 1. Активность кислой фосфатазы в органах плотвы из оз. Каменное, оз. Койвас и хвостохранилища Костомукшского ГОК ($n = 4-5$)

Данные по активности лизосомальных нуклеаз показывают, что происходит увеличение активности РНКазы во всех органах, кроме гонад, у особей из водоемов, подвергающихся воздействию техногенных вод Костомукшского ГОК. Активность же ДНКазы выше во всех органах плотвы из хвостохранилища (рис. 2).

По содержанию белка в органах плотвы из этих водоемов различия были незначительными, за исключением гонад: у плотвы из хвостохранилища его уровень был на 56 % выше, чем у рыб из оз. Койвас (рис. 3).

Очень интересным, на наш взгляд, является изменение активности лизосомальных глико-

зидаз. Отмечено повышение уровня активности β -глюкозидазы во всех органах плотвы из оз. Койвас и Костомукшского хвостохранилища по сравнению с особями, обитающими в не загрязняемом техногенными водами комбината оз. Каменное. В отличие от β -глюкозидазы активность β -галактозидазы практически во всех органах плотвы из оз. Койвас и хвостохранилища была ниже, чем у особей, обитающих в чистом озере (рис. 4).

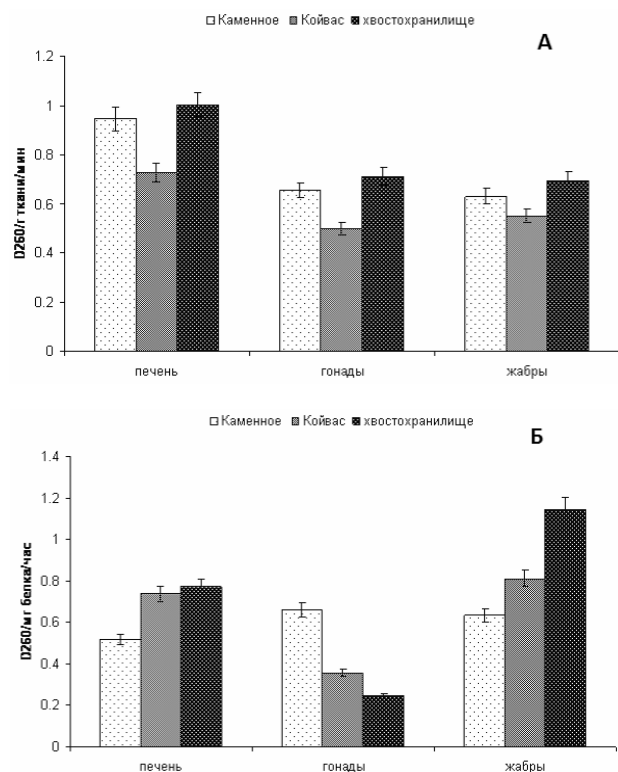


Рис. 2. Активность лизосомальных нуклеаз в органах плотвы из озера с разной степенью антропогенной нагрузки (А – ДНКазы, Б – РНКазы)

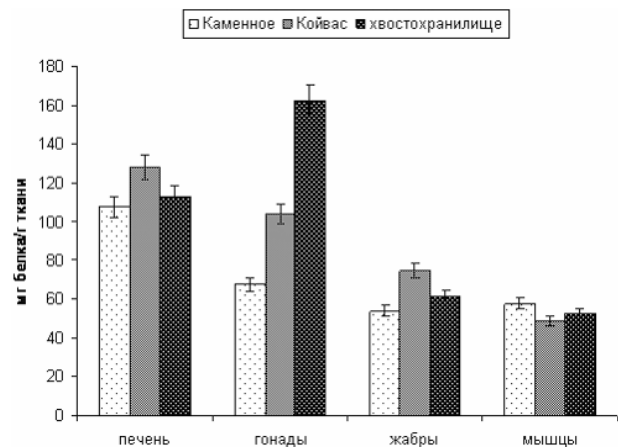


Рис. 3. Содержание белка в органах плотвы из оз. Каменное, оз. Койвас и хвостохранилища Костомукшского ГОК

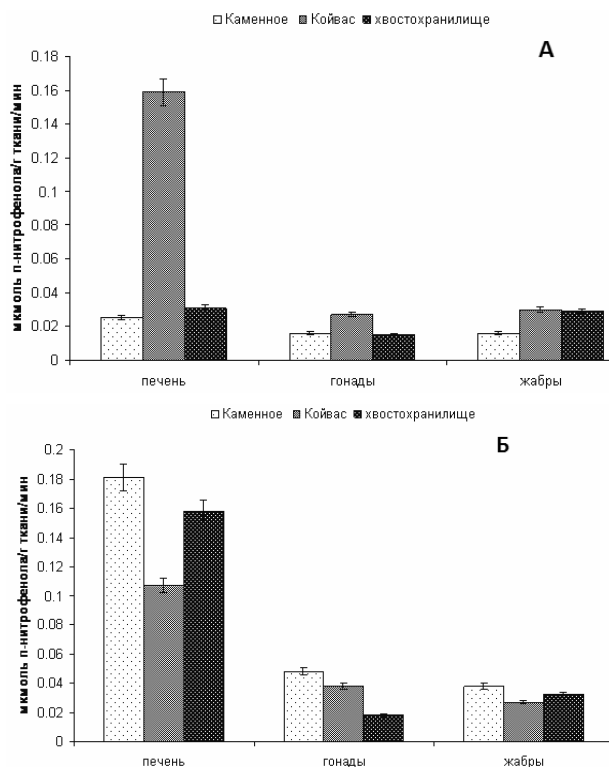


Рис. 4. Активность лизосомальных гликозидаз плотвы, обитающей в водоемах с разным уровнем минерального загрязнения (А – β -глюкозидаза, Б – β -галактозидаза)

Обсуждение результатов

Полученные данные показывают, что лизосомальные ферменты проявляют различную реакцию по отношению к минеральному загрязнению, которая зависит от интенсивности и состава загрязнения. Наиболее значительные изменения в активности лизосомальных ферментов отмечены в печени и жабрах. Именно в печени происходят основные биосинтетические процессы, в том числе выработка белков и ферментов, позволяющих рыбам приспособиться к жизни в условиях постоянной интоксикации [Немова, Высоцкая, 2004]. Высокий уровень активности ферментов в жабрах объясняется тем, что у рыб, в отличие от высших позвоночных, в регуляции калия большая роль отводится жаберному аппарату [Романенко, 1994]. Наличие в среде обитания рыб высоких концентраций калия вызывает активацию работы органа.

Вода хвостохранилища, в которой по сравнению с природным фоном во много раз превышено содержание калия, сульфатов, гидрокарбонатов и других компонентов, является остро токсичной для беспозвоночных и некоторых видов рыб [Сидоров и др., 2003; Такшеев, 2005; Калинкина, 2010]. В ходе специально поставленных экспериментов было установлено, что

токсичным компонентом являются соли калия, особенно для ранних эмбрионов и личинок рыб [Высоцкая и др., 2000]. Важное значение имеют наличие взвеси и щелочная реакция вод хвостохранилища. Даже разбавленная вода хвостохранилища оказалась остро токсичной для окуня. Активность лизосомальных гидролаз в органах этих рыб была резко снижена, следствием чего стала угнетенность всех катаболических процессов, исключалась возможность использования внутренних резервов на экстренные энергетические и пластические нужды [Такшеев, 2005]. Похожая реакция наблюдалась у плотвы в настоящем исследовании, если судить по активности кислой фосфатазы в органах рыб из загрязненных водоемов. Однако снижение активности лизосомального аппарата у плотвы зависело от интенсивности и состава загрязнения. Более высокая активность ферментов у рыб из хвостохранилища, по сравнению с аналогичными показателями у рыб из оз. Койвас, свидетельствует о том, что плотва сумела приспособиться к данному минеральному загрязнению и у нее наблюдаются сдвиги в активности ферментов, позволяющие мобилизовать защитные силы организма, использовать внутренние ресурсы для обеспечения процессов жизнедеятельности в неблагоприятной среде.

Сравнение изученных биохимических показателей в органах самок плотвы из оз. Койвас и хвостохранилища Костомукшского ГОК свидетельствует о том, что адаптивные сдвиги метаболизма у рыб в нижних озерах системы Кенти – Кенто носят менее напряженный характер, чем в хвостохранилище. Содержание белка изменяется незначительно, однако у особей из оз. Койвас его уровень был немного выше в печени и жабрах, чем у плотвы из хвостохранилища. Это обстоятельство подтверждает, что в оз. Койвас условия обитания более благоприятны, чем в хвостохранилище. Однако в гонадах отмечен более высокий уровень содержания белка, что можно связать с разной стадией зрелости гонад особей. В хвостохранилище в условиях хронического загрязнения плотва созревает раньше, и на момент сбора ее гонады были на IV стадии зрелости, в то время как у плотвы из оз. Койвас и чистого оз. Каменное – на II стадии.

Активность кислой фосфатазы была выше во всех органах плотвы (за исключением гонад) из хвостохранилища по сравнению с особями из оз. Койвас, однако значения активности у особей из обоих водоемов были более низкими по сравнению с рыбами из оз. Каменное. Увеличение активности нуклеаз свидетельствует о мобилизации защитных функций организма в условиях хронического загрязнения водоема. Данное об-

стоятельство подтверждает, что и в том, и в другом водоеме стратегия биохимической адаптации сходная, т. е. происходит угнетение активности кислой фосфатазы – фермента маркера лизосом [Gu et al., 2006], а также процесса биосинтеза белка, о чем свидетельствует более низкая активность нуклеаз по сравнению с аналогичным показателем у рыб из чистого озера.

Особенностью реакции лизосомальных гликозидаз на данный тип минерального загрязнения является более высокая активность β -глюкозидазы во всех органах плотвы из оз. Койвас и хвостохранилища, а β -галактозидазы – более низкая по сравнению с таковой у рыб, обитающих в незагрязненном оз. Каменное. Это позволяет заключить, что наибольший вклад в адаптивные реакции плотвы вносит β -глюкозидаза за счет вовлечения содержащих глюкозу компонентов в обеспечение организма энергией. Как известно, воздействие неблагоприятных условий на рыб и других гидробионтов приводит к преобладанию гликолитических процессов. Отмечено значительное повышение активности β -глюкозидазы в печени у плотвы из оз. Койвас, что, возможно, является адаптивной реакцией на данный тип минерального загрязнения. Это подтверждается наблюдениями, что у рыб из хвостохранилища происходит снижение ферментов аэробного метаболизма в печени и переключение на альтернативные источники обеспечения организма энергией [Чурова и др., 2011]. В то же время в ранее опубликованных работах было показано, что у щук больший вклад в адаптивные реакции вносит другая лизосомальная гликозидаза – β -галактозидаза, и это говорит о разных механизмах биохимической адаптации у данных видов [Вдовиченко, Высоцкая, 2013]. Лизосомальные ферменты, участвующие в обмене углеводов, обладают широкой субстратной специфичностью и кроме реакций гидролиза могут участвовать в процессах трансгликозилирования [Winchester, 2005; Husain, 2010; Наумов, 2011], т. е. осуществляют не только катаболизм углеводсодержащих компонентов, но и включаются в метаболизм за счет синтеза регуляторных гликолипидов и протеогликанов. Это делает гликозидазы универсальным инструментом биохимической адаптации. Вероятно, активацию разных гликозидаз у плотвы и щуки можно связать с различиями в образе жизни, в том числе с типом питания указанных видов [Атлас..., 2002]. Плотва является эврифагом, ее рацион довольно разнообразен и зависит от времени года. В летний период плотва питается в основном кормом растительного происхождения, а также мелкими личинками

и водными насекомыми. Щука же – типичный хищник, в ее питании в хвостохранилище преобладает плотва [Биота..., 2012].

Заключение

Проведенные исследования показали, что в процессах адаптации рыб к загрязнению техногенными водами железорудного производства активное участие принимает лизосомальный аппарат печени и жабр.

Особенностью адаптивных реакций плотвы в условиях минерального загрязнения с преобладанием ионов калия является переключение метаболизма на альтернативные источники обеспечения энергией. Важная роль при этом принадлежит лизосомальной β -глюкозидазе.

Выявлена зависимость ответных адаптивных реакций плотвы от интенсивности загрязнения и состава техногенных вод комбината. В нижних водоемах озерно-речной системы Кенти–Кенто, где загрязнение техногенными водами не достигло критических значений, механизмы биохимических адаптаций рыб сходны с теми, что наблюдаются в хвостохранилище Костомукшского ГОК, но носят менее напряженный характер.

Работа выполнена на приборно-аналитической базе Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН при поддержке Программы Президента РФ «Ведущие научные школы РФ» НШ-1642.2012.4 и НШ-1410.2014.4, Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Проблемы происхождения жизни и становления биосферы» № 28 (подпрограмма 2) на 2012–2014 гг., ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (г. к. № 14.740.11.1034), гранта Министерства образования и науки РФ, соглашение № 8594.

Литература

- Атлас пресноводных рыб России. В двух томах. Т. 1 / Под ред. Ю. С. Решетникова. М.: Наука, 2002.
- Баррет А. Дж., Хит Ф. М. Лизосомальные ферменты // Лизосомы. Методы исследования. М.: Мир, 1980. С. 25–156.
- Биота северных озер в условиях антропогенного воздействия. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2012. 230 с.
- Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. А. А. Покровского. М.: Медицина, 1969. 652 с.
- Вдовиченко Е. А., Высоцкая Р. У. Роль лизосомальных гликозидаз в адаптивных реакциях рыб при загрязнении вод отходами железорудного производства // Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов: материалы. Всерос. конф. с междунар. участием. Борок: ИБВВ, 2012. С. 66–68.
- Вдовиченко Е. А., Высоцкая Р. У. Сравнительная характеристика активности лизосомальных гликозидаз у щук, обитающих в водоемах с разным уровнем антропогенной нагрузки // Фундаментальные исследования. 2013. № 4 (часть 5). С. 1134–1138.
- Высоцкая Р. У., Немова Н. Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. М.: Наука, 2008. 284 с.
- Высоцкая Р. У., Каймина Н. В., Сидоров В. С. Влияние различных солей калия на активность некоторых ферментов развивающейся икры радужной форели // Гидробиол. журн. 2000. Т. 36, № 6. С. 82–91.
- Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина, 1969. 29 с.
- Калинкина Н. М. Использование тест-объекта *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg при тестировании техногенных вод горнорудного производства // Водная среда: обучение для устойчивого развития. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2010. С. 48–52.
- Кашулин Н. А., Лукин А. А., Амундсен П. П. Рыбы пресных вод Субарктики как биоиндикаторы техногенного загрязнения. Апатиты: Кольский научный центр РАН, 1999. 142 с.
- Левицкий А. П., Барабаш Р. Д., Коновец В. М. Сезонные особенности активности рибонуклеазы и α -амилазы слюны и слюнных желез у крыс линии Вистар // Биохимическая эволюция. Л.: Наука, 1973. С. 192–195.
- Лозовик П. А., Куликова Т. П., Мартынова Н. Н. Мониторинг водных объектов Республики Карелия в 1992–2000 гг. // Гидроэкологические проблемы Карелии и использование водных ресурсов. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2003. С. 135–144.
- Мещерякова О. В., Чурова М. В., Немова Н. Н. Изменение активности некоторых митохондриальных ферментов органов рыб при антропогенной нагрузке // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: материалы III междунар. конф. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2010. С. 116–117.
- Моисеенко Т. И. Водная экотоксикология: Теоретические и прикладные аспекты. М.: Наука, 2009. 400 с.
- Морозов Д. Н., Высоцкая Р. У. Сравнительное изучение желчно-кислотного состава желчи европейской ряпушки *Coregonus albula* и сига *Coregonus lavaretus* в условиях техногенного загрязнения водоема // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2007. Т. 43, № 5. С. 410–413.
- Наумов Д. Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз // Биохимия. 2011. Т. 76, вып. 6. С. 764–780.
- Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 215 с.
- Покровский А. А., Арчаков А. И. Методы разделения и ферментной идентификации субклеточных фракций // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1968. С. 5–59.
- Покровский А. А., Кравченко Л. В., Тутельян В. А. Исследование активности ферментов лизосом при действии афлатоксина и митомицина С // Биохимия. 1971. Т. 36, вып. 4. С. 690–696.

Романенко В. Д. Метаболизм калия у пресноводных рыб // Гидробиол. журн. 1994. Т. 30, № 5. С. 63–69.

Сидоров В. С., Немова Н. Н., Высоцкая Р. У., Такшеев С. А. Вариабельность интегрального биохимического индекса у рыб под влиянием техногенных вод горно-обогатительного комбината // Экология. 2003. № 4. С. 280–285.

Состояние водных объектов Республики Карелия. По результатам мониторинга 1998–2006 гг. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. С. 210 с.

Такшеев С. А. Состояние рыбной части сообщества Костомукшского хвостохранилища и его оценка биохимическими методами: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2005. 23 с.

Чурова М. В., Мещерякова О. В., Ильмаст Н. В., Немова Н. Н. Оценка состояния сигов *Coregonus lavaretus* L., обитающих в хвостохранилище горно-обогатительного комбината, по некоторым биохимическим и молекулярно-генетическим показателям // Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2011. № 3. С. 137–145.

Baba M., Osumi M., Scott S. V., Klionsky D. J., Osumi Y. Two distinct pathways for targeting proteins

from the cytoplasm to the vacuole/lysosome // J. Cell. Biol. 1997. Vol. 139, N 7. P. 1687–1695.

Gu J., Lingyu L., Yu L., Liping X., Rongqing Z. Purification and partial characterization of two acid phosphatase forms from pearl oyster (*Pinctada fucata*) // Compar. Biochem. Physiol. B. 2006. Vol. 143. P. 229–235.

Husain Q. β -galactosidases and their potential applications: a review // Critical Reviews in Biotechnology. 2010. Vol. 30(1). P. 41–62.

Kahovcova J., Odavic R. A simple method of the quantitative analysis of phospholipids separated by thin layer chromatography // J. Chromatogr. 1969. Vol. 40, N 1. P. 90–96.

Köhler A. Lysosomal perturbations in fish liver as indicators of toxic effects of environmental pollution // Compar. Biochem. Physiol. C. 1991. Vol. 100, N 1–2. P. 123–127.

Versteeg D. J., Giesy J. P. Lysosomal enzyme release in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirochirus* Rafinesque) exposed to cadmium // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1985. Vol. 14. P. 631–640.

Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins // Glycobiology. 2005. Vol. 15, N 6. P. 1R–15R.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Вдовиченко Елизавета Андреевна

аспирант
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: elizaveta.vdovichenko@gmail.com
тел.: (8142) 769810

Высоцкая Римма Ульяновна

главный научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: rimma@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Vdovichenko, Elizaveta

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: elizaveta.vdovichenko@gmail.com
tel.: (8142) 769810

Vysotskaya, Rimma

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: rimma@bio.krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

УДК 546.48:577.125.8:[581.143.6:582.632.1]

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА МОРФО- И ОРГАНОГЕНЕЗ БЕРЕЗЫ *IN VITRO*

Л. В. Ветчинникова¹, Т. Ю. Кузнецова¹, А. Ф. Титов²

¹Институт леса Карельского научного центра РАН

²Институт биологии Карельского научного центра РАН

В условиях *in vitro* изучалось влияние разных концентраций кадмия (10^{-6} – 10^{-3} М) на морфо- и органогенез березы. Показано, что в концентрации 10^{-6} М кадмий способен стимулировать рост побегов и формирование листового аппарата. Одновременно с этим наблюдалось повышение в содержании ненасыщенных жирных кислот в составе липидов. С увеличением в питательной среде концентрации кадмия до 10^{-5} М происходило его накопление в растущих побегах, что сопровождалось снижением не только скорости органогенеза тканевой культуры, но и уровня ненасыщенности жирных кислот. В варианте с концентрацией кадмия 10^{-4} М отмечено не только ингибирование морфо- и органогенеза березы, но и нарушение процессов поглощения и транспорта минеральных элементов. При этом коэффициент ненасыщенности липидов был близким к единице. Концентрация кадмия 10^{-3} М оказалась критической. В этом случае рост и развитие побегов полностью прекращались, а спустя 5–7 сут они погибали. Судя по полученным данным, одним из важных показателей в развитии защитно-приспособительных реакций побегов березы на воздействие кадмия в условиях *in vitro* является изменение ненасыщенности жирнокислотного состава липидов: она увеличивается при включении механизмов детоксикации металла и снижается при нарушении последних.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Betula pendula* Roth, *Betula pendula* var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, *in vitro*, кадмий, морфо- и органогенез, жирнокислотный состав.

L. V. Vetchinnikova, T. Yu. Kuznetsova, A. F. Titov. EFFECT OF CADMIUM ON *IN VITRO* MORPHO- AND ORGANOGENESIS IN BIRCH

The effect of different concentrations of cadmium (10^{-6} – 10^{-3} M) on the morpho- and organogenesis in birch was studied *in vitro*. It is shown that at a concentration of 10^{-6} M cadmium is able to stimulate the growth of shoots and the formation of foliage. Simultaneously an increase in the content of unsaturated fatty acids in the lipid composition was observed. With the increase in the medium cadmium concentrations up to 10^{-5} M its accumulation occurred in the growing shoots, which was accompanied by a decrease in the rate of organogenesis in tissue culture as well as in the level of unsaturated fatty acids. In the treatment with cadmium concentration of 10^{-4} M, the inhibition of morpho- and organogenesis in birch as well as a decline in the absorption and transport of mineral elements was noted. The coefficient of unsaturated lipids was close to one. Cadmium concentration of 10^{-3} M was critical. In this case the growth and development of shoots stopped completely and 5–7 days later they died back. Based on the obtained data, a change in the unsaturated fatty acid composition of lipids is one of the most important indicators in the development of protective and adaptive response of birch shoots to *in vitro* exposure to cadmium: it increases with an activation of metal detoxification mechanisms and decreases with its malfunction.

Введение

Влиянию тяжелых металлов на рост и развитие растений посвящено большое количество исследований [Ильин, 1991; Das et al., 1997; Vassilev, Yordanov, 1997; Clemens, 2001; Memon et al., 2001; Dong et al., 2005; Казнина и др., 2006; Титов и др., 2007; Kaznina et al., 2008; Серегин, 2009 и др.], но подавляющее большинство из них проводилось на травянистых растениях. Древесные породы изучены в этом отношении гораздо хуже, а имеющиеся работы [Gussarsson, 1994; Gussarsson et al., 1996; Utriainen et al., 1997; Kopponen et al., 2001], касающиеся, в частности, изучения металлоустойчивости березы, носят единичный характер.

Вместе с тем такого рода данные имеют не только большой научный, но и практический интерес, который связан с возможностью восстановления лесов на значительных по площади территориях, загрязненных тяжелыми металлами [Kopponen et al., 2001]. Более того, некоторые исследователи [Amiro, Courtin, 1981; Eltrop et al., 1991; Franiel, Więski, 2005; Диярова и др., 2009; Ветчинникова и др., 2013 и др.] считают, что для этого целесообразно использовать именно березу. Хотя остается открытым вопрос об особенностях реакции березы на действие тяжелых металлов, особенно на ранних этапах их развития, когда растения особенно чувствительны к различным неблагоприятным воздействиям.

Исходя из сказанного выше, целью исследований явилось изучение особенностей морфо- и органогенеза березы в условиях *in vitro* в присутствии в питательной среде разных концентраций кадмия.

Материалы и методы

Опыты проводили с использованием культур тканей березы повислой *Betula pendula* Roth и карельской березы *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, представленной коллекцией клонов, полученной нами ранее из апикальной меристемы и ее производных в условиях *in vitro*. Исходные побеги состояли из стебля длиной 4–5 мм и 1–2 листьев размером около 2 x 3 мм (рис. 1, А).

В качестве питательной среды использовали агаризованную минеральную основу Мурашиге–Скуга [Murashige, Skoog, 1962]. При про-

ведении опытов в питательную среду одноразово вносили уксуснокислую соль кадмия (Cd^{+2}) в концентрациях 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} или 10^{-3} М. Об устойчивости тканей березы к действию кадмия судили по их способности к морфо- и органогенезу (рост стебля, число листьев и их площадь, формирование новых побегов). Культивирование осуществляли в течение 30 сут при температуре 25 ± 2 °C, 16-часовом фотопериоде и искусственном освещении (4,5 клк).

Площадь листовых пластинок (после сканирования) определяли путем анализа изображений с привлечением программы SigmaScan Pro 5.0 Image Analysis Software (SPSS Inc, США). Липиды из тканей экстрагировали смесью хлороформа и метанола в соотношении 2:1 по объему [Folch et al., 1957]. Фракции липидов извлекали методом колоночной хроматографии следующими растворителями: нейтральные липиды – хлороформом, гликолипиды – ацетоном, фосфолипиды – метанолом. Жирные кислоты анализировали в виде их метиловых эфиров на газофазной хроматографе «Хроматэк – Кристалл-5000» (Россия). Содержание кадмия, кальция, магния, цинка, марганца и железа определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-6800 («Shimadzu», Япония). Математическую обработку данных осуществляли с помощью общепринятых методов вариационной статистики с использованием пакета программ Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Исследование показало, что в культуре тканей березы повислой и карельской березы с увеличением в питательной среде концентрации кадмия от 10^{-6} до 10^{-3} М происходило его накопление в растущих побегах (рис. 2, А). Отметим, что поступление металла в растительные ткани продолжалось до тех пор, пока величина его концентрации не становилась токсической, что наблюдалось при применении концентрации 10^{-4} М и сопровождалось некротизацией пораженных клеток (рис. 1, Б, Г). Химический анализ побегов контрольного варианта не обнаружил присутствие в них кадмия.

По мнению ряда авторов [Ouzounidou et al., 1997; White, Broadley, 2003], накопление кадмия в тканях может изменяться в зависимости от присутствия Са в питательной среде, что связано с их конкуренцией при транспорте



Рис. 1. Влияние кадмия на рост и развитие побегов березы *in vitro* в начале эксперимента (А) и спустя 7 (Б), 14 (В) и 21 (Г) сут

и поступлении ионов в растительную ткань, поскольку кальций также транспортируется преимущественно по клеточным оболочкам. Однако у разных видов растений влияние кальция на перемещение кадмия неодинаково: у одних растений его накопление в присутствии кальция уменьшается, у других – увеличивается. Согласно нашим данным, *in vitro* при токсической концентрации (10^{-4} M) на фоне возрастающего содержания кальция (рис. 2, Б) в побегах изученных берез поступление кадмия усиливалось (см. рис. 2, А), что сопровождалось увеличением его ингибирующего действия на рост.

Вопрос о взаимодействии кадмия с другими металлами изучается в течение многих лет, но до сих пор не получил однозначного ответа.

Тем не менее считается, что кадмий, в свою очередь, также способен влиять на поглощение, транспорт и использование других элементов. В побегах березы, полученных на питательной среде в условиях *in vitro*, кадмий в целом стимулировал поглощение как макроэлементов – кальция, магния (см. рис. 2, Б, В), так и микроэлементов – цинка, марганца и железа (рис. 2, Г–Е). Однако в небольших концентрациях кадмий препятствовал поступлению магния (см. рис. 2, В), цинка (см. рис. 2, Г) и железа (см. рис. 2, Е). Ранее подобные результаты были получены в экспериментах с травянистыми растениями [Ильина и др., 1979; Peterson, Girling, 1981].

Проведенные исследования также показали, что реакция березы повислой и карельской

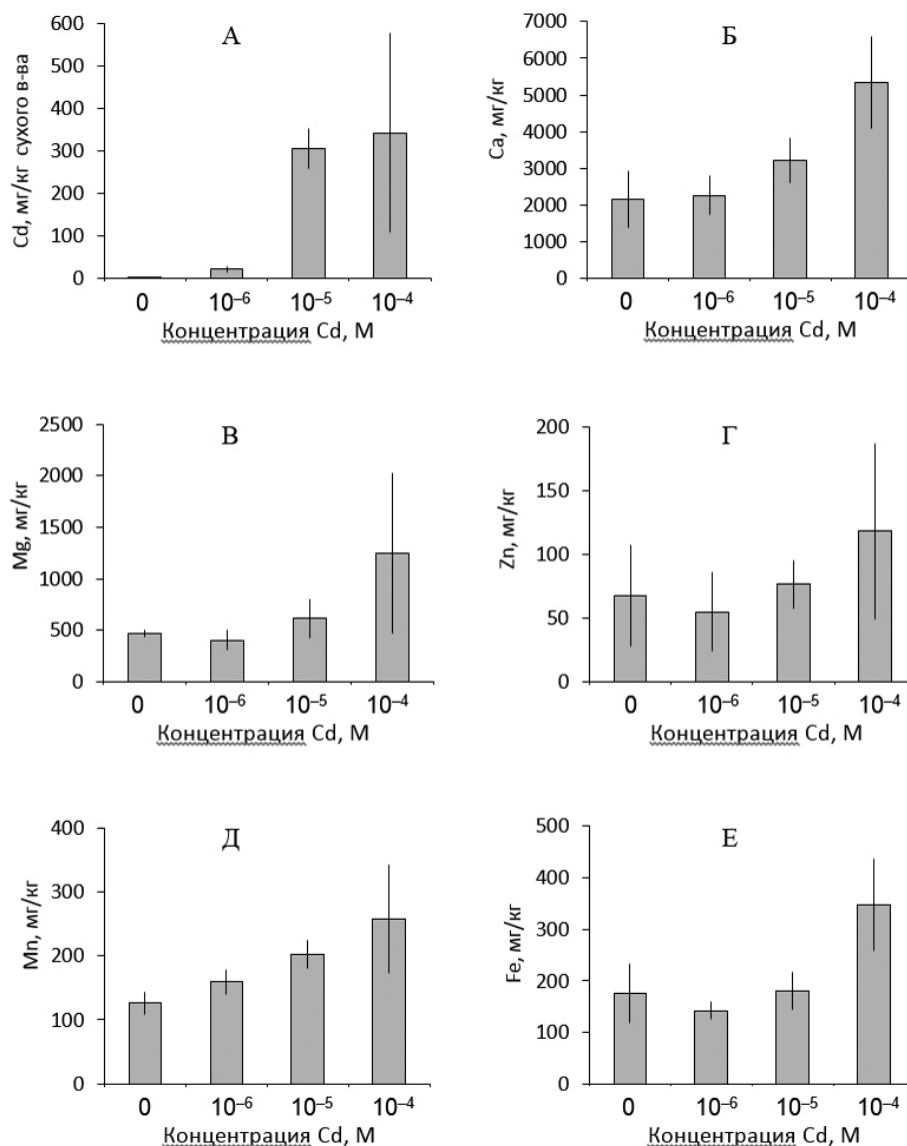


Рис. 2. Содержание кадмия (А), кальция (Б), магния (В), цинка (Г), марганца (Д) и железа (Е) в побегах березы (спустя 28 сут от начала эксперимента *in vitro*)

березы на воздействие кадмия в условиях культуры тканей носит однотипный характер и не зависит от их видовых особенностей. Опыты выявили небольшое стимулирующее действие кадмия в самой низкой из изученных концентраций (10^{-6} М). Так, уже на 7-е сут от начала эксперимента отмечена индукция деятельности пазушных меристем и рост побегов (см. рис. 1, Б; 3, А, Б). Положительное влияние металла отразилось также на суммарной площади фотосинтезирующей поверхности листьев: она увеличилась более чем на 20 % (рис. 3, В). Кроме того, в присутствии в питательной среде кадмия в концентрации 10^{-6} М отмечено увеличение суммы ненасыщенных жирных кислот. Особенно заметно это проявилось во фракции гликолипидов, в которых наблюда-

лось повышение коэффициента ненасыщенности (U/S) почти на 20 % (табл.). Предполагается, что подобное стимулирующее действие тяжелых металлов на ростовые процессы может быть связано с активизацией клеточного деления, изменением баланса гормонов или усилением хелатирующей способности клеток растений для ионов этого металла [Титов и др., 2007 и др.]. В условиях культуры тканей подобный эффект может усиливаться за счет высокой синтетической активности клеток развивающихся морфологических структур, которые делают их аттрагирующим центром для транспорта питательных веществ.

Возрастание концентрации кадмия в питательной среде до 10^{-5} М сопровождалось угнетением роста побегов, уменьшением площади

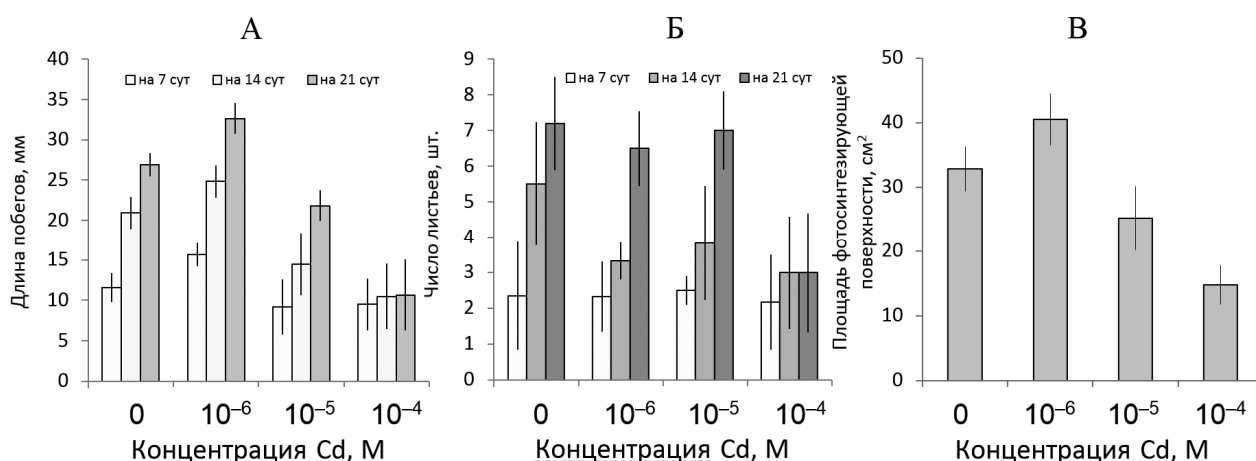


Рис. 3. Влияние кадмия на рост побегов березы (А), образование листьев (Б) и их площадь (В) *in vitro*

листовых пластинок (рис. 3, А, В), а также заметным снижением коэффициента ненасыщенности как в нейтральных липидах, так и в гликолипидах (см. табл.). Ингибирование роста побегов кадмием, а также уменьшение площади листовых пластинок по сравнению с контрольными, очевидно, явилось следствием негативного влияния металла на процессы как деления, так и растяжения клеток [Гуральчук, 1994; Серегин, Иванов, 2001; Титов и др., 2007; Серегин, 2009 и др.].

Нарушения фотосинтетического аппарата побегов *in vitro* под влиянием кадмия визуально проявлялись не только в изменении размеров листовых пластинок, их числа, но и в хлорозе. Хлороз листьев при избытке кадмия, по мнению ряда авторов, появляется в результате уменьшения количества зеленых пигментов, главной причиной которого является подавление биосинтеза хлорофилла [Ali et al., 2000; Титов и др., 2007] и изменение структуры внешней мембраны хлоропластов [Barceló et al., 1988; Vassilev, Yordanov, 1997; Ouzounidou et al., 1997], а также мембран тилакоидов [Skorzynska-Polit, Baszynski, 1997]. В отдельных случаях хлороз в присутствии кадмия обуславливается его взаимодействием с другими металлами [Godbold, Hüttermann, 1985; Krots et al., 1989 и др.].

При внесении в питательную среду кадмия в концентрации 10^{-4} М происходило постепенное прекращение роста и развития побегов, а также угнетение процессов закладки и формирования новых органов (см. рис. 1, 3). На 14-е сут культивирования наблюдалась остановка морфо- и органогенеза (см. рис. 1, В; 3 А, Б). О нарушении процессов поглощения и транспорта минеральных элементов свидетельствует значительное ускорение их поступления в побеги (не менее чем в 2 раза) (см. рис. 2, А).

Одним из важных показателей ответной реакции побегов на содержание в питательной среде разных концентраций кадмия явилось изменение ненасыщенности жирнокислотного состава липидов. Например, если в контроле во всех изученных фракциях содержание ненасыщенных жирных кислот преобладало над суммой насыщенных более чем в 2 раза, то внесение кадмия вызывало заметное увеличение доли насыщенных жирных кислот: в нейтральных липидах – на 40 %, в гликолипидах – на 60 %, в фосфолипидах – на 20 % по сравнению с контролем. В целом это привело к снижению величины коэффициента ненасыщенности липидов (см. табл.). Более того, при применении кадмия в концентрации 10^{-4} М данный показатель оказался близким к единице (см. табл.), что говорит о практически полном выравнивании количества насыщенных и ненасыщенных жирных кислот; это особенно четко проявилось во фракции нейтральных липидов. В глико- и фосфолипидах содержание ненасыщенных жирных кислот уменьшилось более чем на 60 %. Столь существенное снижение уровня ненасыщенных жирных кислот под влиянием кадмия может рассматриваться как нарушение механизмов его детоксикации [Титов и др., 2007] на уровне липидного обмена, ведущее наряду с другими причинами к торможению и прекращению роста и развития побегов березы *in vitro*. По современным представлениям, роль липидных молекул не ограничивается формированием пограничной гидрофобной среды между гидрофильными компартментами клетки. От состава липидной среды зависит проницаемость мембран для различных соединений [Антонов, 1982], а также активность мембранных ферментов и чувствительность мембранных рецепторов [Бурлакова и др., 1982]. Кроме того, некоторые авто-

ры считают, что процессы окисления липидов могут играть роль механизма, регулирующего скорость деления клеток [Волков и др., 1982]. Наконец, показано, что ведущая роль в развитии неспецифических адаптивных реакций принадлежит модификациям мембран и мембранных липидов в сторону преобладания в них ненасыщенных жирных кислот [Белоус, Бондаренко, 1982; Жиров и др., 2007 и др.].

Влияние кадмия на величину коэффициента ненасыщенности (U/S) липидов отдельных фракций, содержащихся в побегах березы *in vitro*

Фракции липидов	Контроль	Концентрация кадмия, М		
		10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
Нейтральные липиды	2,1	2,3	1,8	1,1
Гликолипиды	2,6	3,1	2,3	1,6
Фосфолипиды	2,4	1,9	1,9	1,6

Присутствие в питательной среде кадмия в концентрации 10^{-3} М оказалось критическим для морфо- и органогенеза березы, поскольку рост побегов и развитие листьев полностью прекращались, а спустя 5–7 суток наступала их гибель (см. рис. 1, Б). Вероятно, это связано с тем, что *in vitro* меристема и зона растяжения стебля характеризуются наличием слабодифференцированных тканей, что обуславливает отсутствие физиологических барьеров для беспрепятственного поступления из питательной среды ионов металлов.

Заключение

В целом результаты проведенных исследований показали, что кадмий в концентрации в питательной среде 10^{-6} М способен вызывать стимулирующий эффект на морфо- и органогенез березы *in vitro*, проявляющийся, в частности, в усилении роста побегов и формирования листового аппарата. Вместе с тем установлено, что эти процессы сопровождаются включением механизмов детоксикации металла, связанных с увеличением ненасыщенности жирных кислот, особенно явно выраженным во фракции гликолипидов, играющих важную роль в процессах фотосинтеза. С увеличением концентрации металла (до 10^{-5} М) происходило торможение роста и развития побегов березы, сформированных *in vitro*, на фоне снижения содержания ненасыщенных жирных кислот в составе их липидов. Явно выраженное негативное влияние на рост меристемы и дифференциацию ее производных, а также на темпы морфо- и органогенеза березы в условиях *in vitro* кадмий оказывает в концентрациях 10^{-4} – 10^{-3} М. При токсических дозах кадмия (10^{-4} М) в питательной среде наблюдалось не только

прекращение морфо- и органогенеза, но и нарушение процессов поглощения и транспорта минеральных элементов. При этом коэффициент ненасыщенности липидов оказался близким к единице. Такое резкое снижение содержания ненасыщенных жирных кислот под влиянием кадмия может рассматриваться как нарушение механизма детоксикации этого металла на уровне липидного обмена. Критической для жизнедеятельности оказалась концентрация 10^{-3} М. В этом случае рост и развитие побегов, сформированных *in vitro*, полностью прекращались, а спустя несколько дней они погибали.

Из полученных данных следует, что одним из важных показателей в развитии защитно-приспособительных реакций побегов на воздействие разных концентраций кадмия является изменение степени ненасыщенности жирнокислотного состава липидов, которая повышается при включении механизмов детоксикации и снижается при их нарушении.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам аналитической лаборатории Института леса Карельского научного центра РАН за проведение химических анализов.

Литература

- Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. М.: Наука, 1982. 150 с.
- Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. Киев: Наукова думка, 1982. 255 с.
- Бурлакова Е. Б., Архипова Г. В., Голощапов Л. Н. и др. Мембранные липиды как переносчики информации // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. М.: Наука, 1982. С. 74–83.
- Ветчинникова Л. В., Кузнецова Т. Ю., Титов А. Ф. Особенности накопления тяжелых металлов в листьях древесных растений на урбанизированных территориях в условиях Севера // Труды КарНЦ РАН. Серия Экспериментальная биология. 2013. № 3. С. 68–73.
- Волков В. И., Полежаев А. А., Чернавский Д. С. Роль структурных свойств плазматической мембраны и процессов свободнорадикального окисления липидов в регуляции деления клеток // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. М.: Наука, 1982. С. 74–83.
- Гуральчук Ж. З. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам // Физиология и биохимия культ. растений. 1994. Т. 26, № 2. С. 107–117.
- Диярова Э. З., Гиниятуллин Р. Х., Кулагин А. А. Содержание металлов в древесных растениях, произрастающих на отвалах Учалинского горно-обогатительного комбината Республики Башкортостан // Вестник ОГУ. 2009. № 6. С. 118–120.
- Жиров В. К., Голубева Е. И., Говорова А. Ф., Хайтбаев А. Х. Структурно-функциональные изменения растительности в условиях техногенного загрязнения на Крайнем Севере. М.: Наука, 2007. 166 с.

Ильин В. Б. Тяжелые металлы в системе почва – растения. Новосибирск: Наука, 1991. 151 с.

Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф., Титов А. Ф. Влияние кадмия на апикальные меристемы стебля растений ячменя // Онтогенез. 2006. Т. 37, № 6. С. 444–448.

Серегин И. В. Распределение тяжелых металлов в растениях и их действие на рост: автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2009. 53 с.

Серегин И. В., Иванов В. Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 4. С. 606–630.

Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 172 с.

Ali G., Srivastava P. S., Iqbal M. Influence of Cadmium and Zinc on Growth and Photosynthesis of *Vasopa monniera* Cultivated in Vitro // Biol. Plant. 2000. Vol. 43. P. 599–601.

Amiro B. D., Courtin G. M. Patterns of vegetation in the vicinity of an industrially disturbed ecosystem, Sudbury, Ontario // Canadian Journal of Botany. 1981. Vol. 51. P. 1623–1639.

Barceló J., Vázquez M. D., Poschenrieder C. Structural and Ultrastructural Disorders in Cadmium-Treated Bush Bean Plants (*Phaseolus vulgaris* L.) // New Phytol. 1988. Vol. 108. P. 37–49.

Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis // Planta. 2001. Vol. 212. P. 475–486.

Das P., Samantaray S., Rout G. R. Studies on Cadmium Toxicity in Plants: a Review // Environmental Pollution. Vol. 98, N 1, 1997. P. 29–36.

Dong J., Wu F., Zhang G. Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings // J. Zhejiang Univ. SCI, 2005. 6B (10). P. 974–980.

Eltrop L., Brown G., Joachim O., Brinkmann K. Lead tolerance of *Betula* and *Salix* in the mining area of Mechernich (Germany) // Plant and Soil. 1991. Vol. 131. P. 275–285.

Folch J., Lees M., Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226, N 1. P. 497–509.

Franiel I., Więski K. Leaf features of silver birch (*Betula pendula* Roth). Variability within and between two populations (uncontaminated vs Pb-contaminated and Zn-contaminated site) // Trees. 2005. Vol. 19, N 1. P. 81–88.

Godbold D. L., Hüttermann A. Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation of *Picea abies* (Karst.) seedlings, and the significance of these metals to forest die-back // Environmental Pollution. 1985. Vol. 38. P. 375–381.

Gussarsson M. Cadmium-induced changes in nutrient composition and growth of birch (*Betula pendula*). Swedish University of Agricultural Sciences Department. 1994. 29 p.

Gussarsson M., Asp H., Adalsteinsson S., Jensén P. Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch (*Betula pendula*) by buthionine sulfoximine (BSO) // J. Exp. Botany. 1996. Vol. 47, N 295. P. 211–215.

Kaznina N. M., Titov A. F., Laidinen G. F., Talanov A. V., Talanova V. V. Effect of cadmium on Poaceae plants / XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (Tampere, Finland, 17–22 August 2008). Abstract P09–083 // Physiologia Plantarum. 2008. Vol. 133, N 3.

Kopponen P., Utriainen M., Lukkari K., Suntioinen S., Kärenlampi L., Kärenlampi S. Clonal differences in copper and zinc tolerance of birch in metal-supplemented soil // Environmental Pollution. 2001. Vol. 112. P. 89–97.

Krotz R. M., Evangelou B. P., Wagner G. J. Relationships between Cadmium, Zinc, Cd-Peptide, and Organic Acid in Tobacco Suspension Cells // Plant Physiol. 1989. Vol. 91, N 2. P. 780–787.

Memon A. R., Aktoprakligil D., Ozdemir A., Vertii A. Heavy Metal Accumulation and Detoxification Mechanisms in Plants // Turk J. Bot. 2001. Vol. 25. P. 111–121.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. P. 437–497.

Ouzounidou G., Moustakas M., Eleftheriou E. P. Physiological and Ultrastructural Effects of Cadmium on Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1997. Vol. 32. P. 154–160.

Peterson P. J., Girling C. A. Other trace metals // Effect of Heavy Metal Pollution on plants. 1981. Vol. 1: Effects of trace metals on plant function. Lepp N. W. (ed.) London: Applied Science Publishers. P. 213–278.

Skorzynska-Polit E., Baszynski T. Difference in Sensitivity of the Photosynthetic Apparatus in Cd-Stressed Runner Bean Plants in Relation to Their Age // Plant Sci. 1997. Vol. 128. P. 11–21.

Utriainen M. A., Kärenlampi L. V., Kärenlampi S. O., Schat H. Differential tolerance to copper and zinc of micropropagated birches tested in hydroponics // New Phytol. 1997. Vol. 137. P. 543–549.

Vassilev A., Yordanov I. Reductive Analysis of Factors Limiting growth of Cadmium-Treated Plants: A Review // Bulg. J. Plant Physiol. 1997. Vol. 23. P. 114–133.

White Ph. J., Broadley M. R. Calcium in Plants // Annals of Botany. 2003. Vol. 92. P. 487–511.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ветчинникова Лидия Васильевна

зав. лаб. лесных биотехнологий, д. б. н.
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: vetchin@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

Vetchinnikova, Lidiya

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: vetchin@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 768160

Кузнецова Татьяна Юрьевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: vetchin@krc.karelia.ru

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, руководитель лаб.
экологической физиологии растений,
чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769710

Kuznetsova, Tatiana

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: vetchin@krc.karelia.ru

Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: titov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769710

УДК 581.1

СОДЕРЖАНИЕ НЕПРОТЕИНОВЫХ ТИОЛОВ В КЛЕТКАХ КОРНЯ ДИКОРАСТУЩИХ МНОГОЛЕТНИХ ЗЛАКОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ КАДМИЯ И СВИНЦА

Н. М. Казнина, А. Ф. Титов, Ю. В. Батова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В условиях вегетационного опыта изучено влияние кадмия (40 мг/кг субстрата) и свинца (400 мг/кг субстрата) на содержание непротеиновых тиолов в клетках корня дикорастущих многолетних злаков – тимopheевки луговой (*Phleum pratense* L.) и пырея ползучего (*Elytrigia repens* L. (Nevski)). Растения выращивали в течение 40 дней в присутствии тяжелых металлов, что приводило к значительному увеличению содержания фитохелатинов в клетках корня обоих видов, особенно выраженное при действии кадмия. В отношении восстановленного глутатиона (GSH) отмечены заметные межвидовые различия: у тимopheевки содержание GSH сильнее возрастало в присутствии кадмия, а у пырея – в присутствии свинца. Указанные различия корреспондировались с устойчивостью вида к изученным металлам. Кроме того, многолетние злаки оказались способными накапливать значительные количества тяжелых металлов в корнях, причем если тимopheевка в большей степени аккумулировала кадмий, то пырей – свинец. На основании полученных результатов сделан вывод о возможности использования тимopheевки луговой для фиторемедиации почв, загрязненных кадмием, а пырея – загрязненных свинцом.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Phleum pratense* L., *Elytrigia repens* L. (Nevski), восстановленный глутатион, фитохелатины, кадмий, свинец.

N. M. Kaznina, A. F. Titov, Yu. V. Batova. THE CONTENT OF NON-PROTEIN THIOLS IN ROOT CELLS OF WILD PERENNIAL GRASSES (*PHLEUM PRATENSE* L. AND *ELYTRIGIA REPENS* L.) TREATED WITH CADMIUM AND LEAD

The effect of cadmium (40 mg/kg of substratum) and lead (400 mg/kg of substratum) on the content of non-protein thiols in the root cells of wild perennial grasses – timothy (*Phleum pratense* L.) and couch grass (*Elytrigia repens* L. (Nevski)) was studied in a greenhouse experiment. The plants were grown for 40 days in the presence of heavy metals, resulting in a significant increase in phytochelatins content in the root cells of both species, especially under the influence of cadmium. In regard to reduced glutathione (GSH), the following differences between the species were observed: GSH content in timothy increased at a faster rate in the presence of cadmium, while in couch grass – in the presence of lead. These differences corresponded to the resistance of the plant species to the heavy metals. In addition, perennial grasses appeared to be capable of accumulating significant amounts of heavy metals in the roots. Thus, timothy largely accumulated cadmium, while couch grass accumulated lead. Based on the obtained results, a conclusion about the possibility of using timothy for phytoremediation of soils contaminated with cadmium, and couch grass for those contaminated with lead, was drawn.

Введение

Значительные масштабы загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами вызвали во второй половине XX века резкое усиление интереса исследователей к вопросу об их влиянии на живые организмы, включая растения. При этом в последние годы наибольшее внимание уделяется изучению механизмов металлоустойчивости, действующих на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях организации, понимание которых на сегодняшний день заметно расширилось и углубилось [Meharg, 2005; Clemens et al., 2006; Gallego et al., 2012]. Вместе с тем необходимо констатировать, что в основном такого рода исследования проводятся с использованием весьма ограниченного набора видов, принадлежащих главным образом к семействам *Brassicaceae* и *Fabaceae*. Растения из семейства *Poaceae*, особенно дикорастущие виды, в этом отношении почти не изучены, хотя некоторые из них отличаются высокой металлоустойчивостью и успешно произрастают на территориях со значительным загрязнением почвы тяжелыми металлами [Безель, Жуйкова, 2007; Лайдинен и др., 2011]. Поэтому изучение механизмов, обеспечивающих устойчивость растений этих видов к высоким концентрациям тяжелых металлов в окружающей среде, представляет не только значительный научный, но и практический интерес в связи с перспективой их возможного использования для фиторемедиации почв.

Учитывая это, целью данной работы явилось изучение влияния кадмия и свинца, которые относятся к числу наиболее распространенных и высокотоксичных тяжелых металлов, на содержание непротеиновых тиолов (глутатиона и фитохелатинов) у дикорастущих многолетних злаков – тимopheевки луговой (*Phleum pratense* L.) и пырея ползучего (*Elytrigia repens* L. (Nevski)).

Материалы и методы

Семена злаков проращивали в чашках Петри при температуре воздуха 22 °C в течение 7 дней, после чего высаживали в сосуды с песком объемом 1 дм³. В опытных вариантах в сосуды добавляли кадмий в концентрации 40 мг/кг субстрата или свинец в концентрации 400 мг/кг субстрата. Используемые концентрации металлов вызывали (как это было выявлено в предварительных опы-

тах) 30%-е ингибирование роста корня. Полив растений осуществляли питательным раствором с добавлением микроэлементов. Опыт проводили в вегетационных условиях. Спустя 40 дней в корнях растений определяли концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) и фитохелатинов, а также содержание тяжелых металлов, оценивали их влияние на накопление биомассы растениями и рассчитывали индекс устойчивости.

Количество GSH и фитохелатинов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. После замораживания образцов корней в жидком азоте проводили экстракцию GSH и фитохелатинов с использованием смеси ледяной 6,3 мМ диэтилтриаминпентауксусной кислоты (ДТПА, «Sigma») и 0,1%-й трифторуксусной кислоты («Merck»). Гомогенат центрифугировали при 10 000 об./мин и 4 °C. Полученные экстракты подвергали предколоночной дериватизации с монобромбиманом (mBBBr, «Sigma»). Разделение GSH и фитохелатинов проводили в аналитической колонке Phenomenex Luna 5u C18 при температуре колонки 37 °C и скорости потока 1,0 мл/мин. согласно методике Снеллер с соавт. [Sneller et al., 2000]. Количество непротеиновых тиолов определяли по стандарту GSH («Sigma»). Расчет площадей пиков осуществляли с помощью компьютерной программы Мульти-Хром (Версия 1,5X).

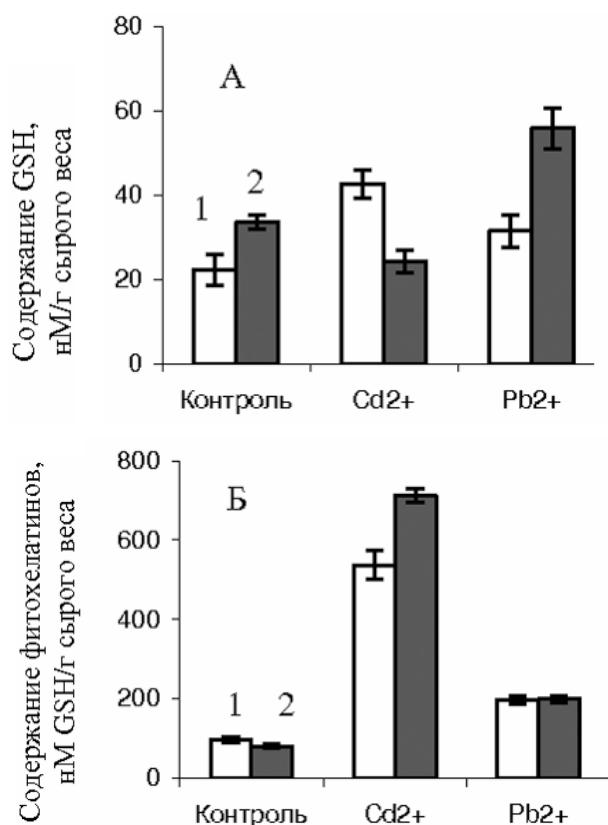
Содержание кадмия в корнях и листьях растений определяли методом инверсионной вольтамперометрии с использованием полярографа ABC-1.1 («Вольта», Россия). Разложение растительных образцов проводили в смеси HNO₃ и H₂O₂ в соотношении 4:1 с использованием микроволновой системы пробоподготовки MC-6 («Вольта», Россия). Индекс устойчивости (I_i) вычисляли по формуле: $I_i = I_{Me}/I_k$, где I_{Me} – биомасса растений опытного варианта; I_k – биомасса растений контрольного варианта.

Биологическая повторность в пределах каждого варианта опыта составляла для разных измерений от 6 до 20 растений. Аналитическая повторность при проведении химических анализов 3–5-кратная. Весь опыт повторяли дважды. В таблице и на рисунке представлены средние значения по двум опытам и их стандартные ошибки. Достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента при $p < 0,05$.

Исследования проведены с использованием научного оборудования ЦКП ИБ КарНЦ РАН.

Результаты

Результаты проведенного исследования показали, что изученные виды злаков способны расти и развиваться в течение длительного времени в присутствии высоких концентраций кадмия и свинца в субстрате. При этом содержание непротеиновых тиолов в клетках корня изменяется (по отношению к контролю) у них в зависимости как от видовой принадлежности, так и от действующего на них металла. В частности, под влиянием кадмия у тимopheевки наблюдалось значительное (в 2 раза) увеличение количества GSH, тогда как у пырея – некоторое его снижение (рис.). Под действием свинца уровень GSH возрастал у обоих видов злаков, но в большей степени (почти в 2 раза) – у пырея. В отличие от этого, содержание фитохелатинов в корнях растений в присутствии свинца повышалось у обоих видов почти в 2 раза. При действии кадмия отмечено еще более резкое увеличение их количества: у тимopheевки – в 6 раз, а у пырея – в 9 раз.



Влияние тяжелых металлов на содержание восстановленного глутатиона (А) и фитохелатинов (Б) в клетках корня растений тимopheевки луговой (1) и пырея ползучего (2)

Учитывая, что уровень непротеиновых тиолов в клетке в присутствии тяжелых металлов во многом зависит от количества токсичных

ионов в органах растений [Maier et al., 2003; Tausz et al., 2004; Gard, Kaur, 2013], нами проведен анализ содержания кадмия и свинца в корнях растений (табл.). Он показал, что оба вида злаков способны накапливать значительные количества тяжелых металлов. Однако если у тимopheевки содержание кадмия было выше, чем у пырея, то пырей в большей степени аккумулировал свинец (его концентрация почти в 2 раза превышала концентрацию в корнях тимopheевки). Важно также отметить, что тимopheевка при этом оказалась более устойчивой к кадмию ($I_t = 0,72$), тогда как пырей гораздо более устойчив к свинцу ($I_t = 1,19$).

Содержание (мг/г сырого веса) тяжелых металлов в корнях тимopheевки луговой и пырея ползучего после 40 дней выращивания на субстратах, содержащих Cd²⁺ (40 мг/кг) или Pb²⁺ (400 мг/кг) и индекс металлоустойчивости растений (I_t)

Вид	Cd ²⁺		Pb ²⁺	
	содержание металла	I_t	содержание металла	I_t
Пырей ползучий	116,2 ± 5,0	0,56	173,9 ± 4,5	1,19
Тимopheевка луговая	128,3 ± 14,8	0,72	95,4 ± 15,5	0,86

Примечание. Содержание Cd²⁺ у растений контрольного варианта составляло 0,2–0,4 мг/г сырого веса; Pb²⁺ – 0,5–0,6 мг/г сырого веса.

Обсуждение

Способность некоторых видов дикорастущих растений накапливать в корнях большое количество тяжелых металлов и при этом демонстрировать высокую металлоустойчивость, отмечена в целом ряде исследований. Например, растения *Alyssum montanum* с высоким содержанием никеля в корнях [Kramer et al., 1996], *Setaria viridis* – с избыточными концентрациями цинка [Казнина и др., 2009] и *Vasopa monnieri* с повышенным уровнем кадмия [Mishra et al., 2006] характеризовались и высокой устойчивостью к этим металлам. Считается, что металлоустойчивость растений обеспечивается прежде всего эффективной работой клеточных механизмов детоксикации, среди которых важную роль играет связывание токсичных ионов непротеиновыми тиолами – GSH и фитохелатинами [Mendoza-Cozalt, Moreno-Sanchez, 2006].

Доказано, что GSH выполняет в клетках растений несколько очень важных функций. Он является одним из наиболее эффективных низкомолекулярных антиоксидантов, участвует в регуляции внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала, клеточном сигналинге, является запасной и транспортной формой серы в клетке, а также предшественни-

ком фитохелатинов [Zhu et al., 1999; Pietrini et al., 2003; Noctor et al., 2011]. В ряде исследований обнаружено изменение уровня GSH в клетке при воздействии тяжелых металлов, хотя о его роли в качестве самостоятельного хелатора токсичных ионов стало известно относительно недавно [Maier et al., 2003; Tausz et al., 2004].

В наших опытах у растений тимopheевки содержание GSH в клетках корня заметно увеличивалось в присутствии кадмия, тогда как у пырея – в присутствии свинца, что коррелировало с устойчивостью видов к этим металлам. Аналогичные данные были получены и другими авторами. Так, при действии кадмия более высокий уровень GSH был обнаружен у более устойчивых к металлу генотипов гороха посевного [Metwally et al., 2005], сортов ячменя [Радюк и др., 2007] и конских бобов [Čabala et al., 2011]. Предполагается, что восстановление пула глутатиона в клетках за счет активации его синтеза способствует повышению устойчивости растений к тяжелым металлам. Причем это связано не только с использованием его молекул на синтез фитохелатинов, но и с участием GSH в качестве основного антиоксиданта при окислительном стрессе, вызванном действием токсичных ионов [Mishra et al., 2006]. В свою очередь, неспособность растений поддерживать высокий уровень GSH приводит к усилению окислительного стресса и увеличению их чувствительности к тяжелым металлам [Mendoza-Cozalt, Moreno-Sanchez, 2006].

Хорошо известно, что в ответ на действие многих тяжелых металлов в клетках растений запускается синтез фитохелатинов, основная роль которых, как предполагается, заключается в связывании токсичных ионов в цитоплазме и транспорте образовавшихся комплексов в вакуоль [Sanita di Toppi, Gabrielli, 1999; Серегин, 2001; Schat et al., 2002; Mishra et al., 2006; Казнина и др., 2012 и др.]. При этом под влиянием кадмия, который является одним из наиболее сильных индукторов их синтеза [Rausser, 1999; Woojcik, Tukendorf, 2005], количество фитохелатинов возрастает в гораздо большей степени, чем, например, в присутствии свинца. Это наблюдалось и нами, а ранее – в экспериментах с растениями кукурузы [Серегин и др., 2007] и ячменя [Радюк и др., 2007].

Заметные межвидовые различия в содержании фитохелатинов были также обнаружены лишь при действии кадмия: большее их количество синтезировалось в клетках корня пырея, по сравнению с тимopheевкой, несмотря на меньшую концентрацию металла в корнях и более низкую устойчивость к нему.

Об отсутствии прямой зависимости между уровнем фитохелатинов в клетках растений, с одной стороны, и их устойчивостью к тяжелым металлам, а также содержанием их ионов в органах, с другой, уже сообщалось ранее. Например, у трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* [Lee et al., 2003] и табака [Wojas et al., 2008] с повышенным уровнем экспрессии гена фитохелатинсинтазы, несмотря на заметно более высокое количество фитохелатинов в корнях в присутствии кадмия, устойчивость к этому металлу оказалась гораздо ниже, чем у растений дикого типа. При одинаковом уровне фитохелатинов в клетках растений разных генотипов овса щетинистого их устойчивость к кадмию, а также содержание металла в органах оказались различными [Uraguchi et al., 2009]. У разных сортов пшеницы количество фитохелатинов в корнях не было связано с концентрацией кадмия в растениях и устойчивостью их к металлу [Stolt et al., 2003]. Полагают, что уменьшение устойчивости растений к тяжелым металлам при высоком уровне фитохелатинов в клетках скорее всего связано с нарушениями, происходящими на других этапах их детоксикации, например, со снижением активности белков, участвующих в транспорте комплексов металлов с непротеиновыми тиолами через тонопласт в вакуоль [Li et al., 2004]. Помимо этого различия в металлоустойчивости видов (сортов, генотипов) могут быть связаны не только с количеством синтезируемых молекул фитохелатинов, но и, возможно даже в большей степени, со скоростью их образования [Ebbs et al., 2002; Schat et al., 2002].

Заключение

Проведенные исследования показали, что растения тимopheевки луговой и пырея ползучего обладают способностью расти и развиваться в условиях повышенного содержания в почве кадмия и свинца и накапливать эти металлы в корнях в относительно больших количествах. При этом тимopheевка оказалась более устойчивой к кадмию, а пырей – к свинцу.

Из полученных данных следует, что в металлоустойчивости злаков важную роль играют непротеиновые тиолы; в присутствии кадмия и свинца у обоих изученных видов существенно увеличивается содержание фитохелатинов в клетках корня, особенно выраженное при действии кадмия. В отношении GSH отмечены заметные межвидовые различия, которые коррелируются с устойчивостью к изученным металлам: у тимopheевки содержание GSH сильнее возрастает в присутствии кадмия, а у пырея – в присутствии свинца.

На основании полученных результатов сделан вывод о возможности использования тимфеетки луговой для фиторемедиации почв, загрязненных кадмием, а пырея – загрязненных свинцом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

Литература

- Безель В. С., Жуйкова Т. В. Химическое загрязнение среды: вынос химических элементов надземной фитомассой травянистой растительности // Экология. 2007. № 4. С. 259–267.
- Казнина Н. М., Титов А. Ф., Лайдинен Г. Ф., Таланов А. В. Устойчивость щетинника зеленого к повышенным концентрациям цинка // Известия РАН. Сер. биологическая. 2009. № 6. С. 677–684.
- Казнина Н. М., Титов А. Ф., Топчиева Л. В., Лайдинен Г. Ф., Батова Ю. В. Влияние возрастных различий на реакцию растений ячменя на действие кадмия // Физиология растений. 2012. Т. 59, № 1. С. 74–79.
- Лайдинен Г. Ф., Казнина Н. М., Батова Ю. В., Титов А. Ф. Состояние травянистой растительности в условиях промышленного загрязнения (на примере южной Карелии) // Растительные ресурсы. 2011. Т. 47, вып. 4. С. 50–60.
- Радюк М. С., Будакова Е. А., Шалыго Н. В. Влияние катионов Cd^{2+} и Pb^{2+} на общий пул тиолов в зеленых листьях ячменя // Вестник НАН Беларуси. Серия биологических наук. 2007. № 3. С. 61–65.
- Серегин И. В. Фитохелатины и их роль в детоксикации кадмия у высших растений // Успехи биол. химии. 2001. Т. 41. С. 283–300.
- Серегин И. В., Vooijs R., Кожевникова А. Д., Иванов В. Б. Влияние кадмия и свинца на накопление фитохелатинов в побегах и различных участках корня кукурузы // Докл. АН. 2007. Т. 215, № 4. С. 571–577.
- Čabala R., Slovák L., El Zohri M., Frank H. Accumulation and translocation of Cd metal and the Cd-induced production of glutathione and phytochelatins in *Vicia faba* L. // Acta Physiol. Plant. 2011. Vol. 33. P. 1239–1248.
- Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants // Biochemie. 2006. Vol. 88. P. 1707–1719.
- Ebbs S., Lau I., Ahner B., Kochian L. Phytochelatins synthesis is not responsible for tolerance in Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* // Planta. 2002. Vol. 214. P. 635–640.
- Gallego S. M., Pena L. B., Barcia R. A., Azpilicueta C. E., Iannone M. F., Rosales E. R., Zawoznic M. S., Groppa M. D., Benavides M. P. Unraveling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms // Env. Exp. Bot. 2012. Vol. 83. P. 33–46.
- Gard N., Kaur H. Response of antioxidant enzymes, phytochelatins and glutathione production towards Cd and Zn stresses in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Genotypes colonized by arbuscular mycorrhizal fungi // J. Agron. Crop Sci. 2013. Vol. 199. P. 118–133.
- Krämer U., Cotter-Howells J. D., Charnock J. M., Baker A. J. M., Smith J. A. C. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel // Nature. 1996. Vol. 379. P. 635–638.
- Li Y., Dhankher O., Lee D., Chen A., Schroeder J., Balish R., Meagher R. Overexpression of phytochelatin synthase in Arabidopsis leads to enhanced arsenic tolerance and cadmium sensitivity // Plant Cell Physiol. 2004. Vol. 45. P. 1787–1797.
- Lee S., Moon J. S., Ko T. S., Petros D., Goldsbrough P. B., Korban S. S. Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress // Plant Physiol. 2003. Vol. 131. P. 656–663.
- Maier E. A., Matthews R. D., McDowell J. A., Walden R. R., Ahner B. A. Environmental cadmium level increase phytochelatin and glutathione in lettuce grown in a chelator-buffered nutrient solution // J. Environ. Qual. 2003. Vol. 32. P. 1356–1364.
- Meharg A. A. Mechanisms of plant resistance to metal and metalloid ions and potential biotechnological applications // Plant Soil. 2005. Vol. 274. P. 163–174.
- Mendoza-Cozatl D. G., Moreno-Sanchez R. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants // J. Theoret. Biol. 2006. Vol. 238. I. 4. P. 919–936.
- Metwally A., Safronova V. I., Belimov A. A., Dietz K. J. Genotypic Variation of response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. // J. Exp. Bot. 2005. Vol. 56. P. 1267–1279.
- Mishra S., Srivastava S., Tripathi R. D., Govindarajan R., Kuriakose S. V., Prasad M. N. V. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. // Plant Physiol. Biochem. 2006. Vol. 44. P. 25–37.
- Noctor G., Queval G., Mhamdi A., Chaouch A., Foyer C. H. Glutathione. In: Arabidopsis Book. American Society of plant Biologists, Rockville, MD. 2011. doi:10.1199/tab.0142.
- Pietrini F., Iannelli M. A., Pasqualini S., Massacci A. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel // Plant Physiol. 2003. Vol. 133. P. 829–937.
- Rausser W. E. Structure and function of metal chelators produced by plants // Cell Biochem. Biophys. 1999. Vol. 31. P. 19–48.
- Sanita di Toppi L., Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants // Environ. Exp. Bot. 1999. Vol. 41. P. 105–130.
- Schat H., Llugany M., Vooijs R., Hartley-Whitaker J., Bleeker P. A. The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes // J. Exp. Bot. 2002. Vol. 53, N 379. P. 2381–2392.
- Sneller F. E. S., van Heerwaarden L. M., Koevoets P. L. M., Vooijs R., Schat H., Verkleij A. C. Derivatization on phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's Reagent and Monobromobimane // J. Agric. Food Chem. 2000. Vol. 48. P. 4014–4019.

Stolt J. P., Sneller F. E. C., Bryngelsson T., Lundborg T., Schat H. Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat // *Env. Exp. Bot.* 2003. Vol. 49. P. 21–28.

Tausz M., Sircelj H., Grill D. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid // *J. Exp. Bot.* 2004. Vol. 55. P. 1955–1962.

Uraguchi S., Mori S., Kuramata M. et al. Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice // *J. Exp. Bot.* 2009. Vol. 60, N 9. P. 2677–2688.

Wojas S., Clemens St., Hennig J., Skłodowska A., Kopera E., Schat H., Bal W., Antosiewicz D. M. Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: distinctive effects of *AtPCS* and *CePCS* genes on plant response to cadmium // *J. Exp. Bot.* 2008. Vol. 59, N 8. P. 2205–2219.

Wójcik M., Tukiendorf A. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays* // *Biol. Plant.* 2005. Vol. 49, N 2. P. 237–245.

Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Tarun A. S., Jouanin L., Terry N. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance // *Plant Physiol.* 1999. Vol. 119. P. 73–79.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Казнина Наталья Мстиславовна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: kaznina@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, руководитель лаб.
экологической физиологии растений,
чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769710

Батова Юлия Валерьевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: batova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

Kaznina, Natalia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: kaznina@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: titov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769710

Batova, Yulia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: batova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 762706

УДК 581.154+575.224.46: 582.542.1.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СУПРЕССИРОВАННОЙ ТЕМПЕРАТУРОЗАВИСИМОЙ ХЛОРОФИЛЛДЕФЕКТНОСТИ У *FESTUCA PRATENSIS* HUDS

О. Н. Лебедева, Т. С. Николаевская, А. Ф. Титов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Показана роль генетической и эпигенетической составляющей в формировании естественного генетического груза и приспособленности M_5 -мутантных потомств многолетнего перекрестноопыляющегося злака овсяницы луговой (*Festuca pratensis* Huds.), сформировавшихся при различных уровнях почвенного питания (высоком, умеренном и низком) материнских растений. Оценена величина пула проростков с супрессированной хлорофиллдефектностью, выживаемость и плодовитость растений, действие стабилизирующего отбора в отношении изученных признаков.

К л ю ч е в ы е с л о в а: супрессированная температурозависимая хлорофиллдефектность, генетическая и эпигенетическая изменчивость, выживаемость, плодовитость, приспособленность, стабилизирующий отбор, *Festuca pratensis* Huds.

O. N. Lebedeva, T. S. Nikolaevskaya, A. F. Titov. GENETIC AND EPIGENETIC VARIABILITY OF SUPPRESSED AND TEMPERATURE-DEPENDENT CHLOROPHYLL DEFICIENCY IN *FESTUCA PRATENSIS* HUDS.

The role of the genetic and epigenetic component in the formation of the natural genetic load and fitness of M_5 -mutant posterities of perennial cross-pollinated grass *Festuca pratensis* Huds. is shown. M_5 -mutant generations were created at different levels (high, moderate and low) of soil fertility nutrition available to maternal plants. The size of the seedling pool with a suppressed chlorophyll deficiency, survival and fertility of plants, influence of stabilizing natural selection as applied to the above components of fitness were estimated.

Key words: suppressed temperature-dependent chlorophyll deficiency, genetic and epigenetic variability, survival, fertility, fitness, stabilizing natural selection, *Festuca pratensis* Huds.

Введение

К настоящему времени в научной литературе накоплено большое число фактов, указывающих на широкое распространение эпигенетической изменчивости у растений и животных [Уоддингтон, 1970; Чураев, 1982, 1997; Голу-

бовский, 1996, 2000; Оленов, 1970; Малецкий и др., 2004 и др.]. В последние годы большинство исследований в этой области сосредоточено на изучении механизмов формирования эпигенетических изменений (метилирование ДНК, реструктуризация хроматина за счет метилирования или ацетилирования гистоновых

белков, транспозиция мобильных элементов и др.) [Cocciolone, Conek, 1993; Vongs et al., 1993; Das, Messing, 1994; Richards, 1997; Amedeo et al., 2000; Martienssen, Colot, 2001; Vyskot, 2000; Лавров, Мавродиев, 2003 и др.]. Значительно реже рассматривается влияние внешних факторов на формирование эпигенетических изменений тех или иных признаков растений [Кирикович, Левитес, 2005].

Целью настоящего исследования явилось изучение изменчивости признаков (пул проростков с супрессированной хлорофиллдефектностью, выживаемость и плодовитость растений) M_5 -мутантных потомств многолетнего перекрестноопыляющегося злака *F. pratensis*, сформировавшихся при различных уровнях почвенного питания (высоком, умеренном и низком) материнских растений, и действия отбора.

Материалы и методы

Оценку биологических особенностей M_5 -мутантных потомств *F. pratensis* проводили на основе анализа семян, сформировавшихся при свободном опылении M_4 -растений, которые росли при различных уровнях почвенного питания материнских растений: высоком (60 т/га органических удобрений и N120P60K60), умеренном (N60P60K60) и обедненном (без внесения удобрений) [Лебедева и др., 2012]. Всего изучено 40 растений семи мутантных потомств и одной контрольной популяции на каждом фоне почвенного питания.

Генетическая оценка де- и ресупрессии проростков овсяницы луговой проводилась в лабораторном эксперименте при проращивании семян в условиях фитотрона в течение 10 сут при непрерывной освещенности ($96-120 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) и температуре 35 °C. В массиве проростков регистрировали зеленые (*w-type* или *norma*, N) и депигментированные растения. Депигментированные проростки восстанавливали полностью или частично зеленую окраску листа через 4 сут при снижении температуры до 25 °C (функциональная реверсия). Подсчитывали количество зеленых и депигментированных проростков при 35 °C (десупрессия) и 25 °C (частично или полностью восстановивших окраску листа до зеленой – ресупрессия). Для обозначения конкретных фенотипов использовали начальные латинские буквы соответствующего типа депигментации.

Депигментированные проростки восстанавливали зеленую окраску листа (ресупрессия) с различной скоростью и двумя путями: через реверсию и репопуляцию. Быстрое восстановление путем реверсии происходило при выра-

живании проростков в течение последующих 4 сут или медленно – более 4 сут и только при 25 °C. Восстановление окраски проростка до *w-type* происходило также через репопуляцию клеток базальной части проростка. При этом быстрое восстановление наблюдалось уже на 7-е сутки при температуре 35 °C. Медленная репопуляция, так же как и реверсия, происходила при 25 °C. Выявлены различные сочетания скорости и механизмов восстановления (быстрая реверсия – медленная реверсия и быстрая репопуляция – медленная репопуляция). Это позволило выделить и зарегистрировать несколько фенотипических групп проростков.

Приспособленность растений у M_5 -мутантных потомств оценивалась по ряду признаков: фертильность пыльцы [Паушева, 1974], всхожесть семян, активность роста проростков (частота проростков > 2 см), масса семян на растение и масса 1000 семян.

Выживаемость рассчитывали как произведение значений (в долях) фертильности пыльцы, всхожести семян и активности роста.

Плодовитость (k) – количество семян на растение – определяли расчетным путем, исходя из двух основных компонентов: массы семян с одного растения (M) и массы 1000 семян (T) по формуле: $k = M/(T/1000)$.

Приспособленность – произведение относительной выживаемости и плодовитости: $W = v * k$, где v – выживаемость, k – плодовитость, W – приспособленность в долях относительно контрольной популяции. Элиминирующее действие отбора (S) рассчитывали по формуле: $S = 1 - W$. Относительную приспособленность оценивали на основе сравнения значений признаков у растений экспериментальных и контрольной популяций.

Для оценки действия естественного отбора (стабилизирующей формы) вычисляли среднюю арифметическую, а также разность между средним и конкретным значением соответственно для каждого признака. Полученные ряды разностей ранжировали. По диаграммам рядов разностей от средней вычисляли тренды (линии рассеивания) и по углу их наклона (крутизны) устанавливали степень различий между группами индивидуумов (особей) в отношении действия стабилизирующего отбора. Использовали формулу: $y = a + bx$, где y – разность между средним и конкретным значением признака; a – значение пересечения линии тренда с осью Y ; b – tg угла наклона линии тренда, x – номер ранга особи. Отклонения от среднеарифметических в большинстве случаев значительно отличались друг от друга при $p < 0,05$, что вместе с высокими (> 80 %) коэффициентами детерминации позво-

ляет считать результаты статистически достоверными. Все вычисления проведены в программе MS Excel 6 [Кох, 1994]. Исследование выполнено на оборудовании ЦКП ИБ КарНЦ РАН.

Результаты и обсуждение

Генетический анализ хлорофиллдефектности при десупрессии, когда функция гена-супрессора подавлена, показал, что соотношение зеленых и хлорофиллдефектных проростков в экспериментальном пуле у с. Карельская (контроль) и у M_5 -мутантных потомств растений *F. pratensis*, сформированных на основе поликросса, оказалось зависимым от условий культивирования материнских растений. Расщепление соответствовало дигибридной схеме наследования признаков с эпистатическим взаимодействием генов: 3:13 (при высоком уровне почвенного питания материнских растений), 7:9 (при умеренном уровне почвенного питания материнских растений), 4:12 (при низком уровне почвенного питания материнских растений) (табл. 1).

Доля депигментированных проростков в экспериментальном пуле M_5 -мутантных потомств, сформированных при различных условиях почвенного питания материнских растений, в 1,4 раза выше, если материнские M_4 -растения культивировались на высоком (Н)

по сравнению с умеренным (С) и в 1,2 раза по сравнению с низким (L) фонами (табл. 2). Частота проростков *w-type* снизилась в 2 раза в ряду С→L→Н. Частота депигментированных M_5 -проростков с фенотипом *viridis* (V) также снизилась в 2 раза (С→L→Н), а с глубокими типами депигментации – *xantha* (X) и *albina* (A) увеличилась в 1,5 и 3 раза (L→Н→С) соответственно на низком и высоком фоне. Фенотип *xantha* является доминирующим. Изучение спектра комбинированных фенотипов у M_5 -мутантных потомств, сформированных при различных уровнях почвенного питания M_4 -материнских растений, показало, что при низком его уровне (L) у потомств формируется в 2 раза больше депигментированных проростков с отсроченной десупрессией (NV, NX, VX, VA, XA) по сравнению с высоким (H) и умеренным (C). Количество ранних ревертантов (VN, XN, XV) у M_5 -потомств при высоком и низком уровне почвенного питания материнских растений оказалось в 10–12 раз больше, чем при умеренном. Ранние ревертанты с фенотипами AN, AV формируются только при высоком уровне почвенного питания материнских растений (см. табл. 2).

Выявлены и особенности восстановления пигментации при ресупрессии проростков M_5 -мутантных потомств растений *F. pratensis*, сформированных при различных уровнях

Таблица 1. Результаты генетического анализа хлорофиллдефектности 10-дневных проростков *F. pratensis* при десупрессии (температура проращивания семян 35 °C)

Потомство	Фенотип и количество проростков		Соотношение фактически полученных фенотипов	Значение χ^2 при p < 0,05
	зеленый	хлорофилл- дефектный		
Высокий уровень почвенного питания материнских растений				
с. Карельская	38	169	3:13	0,02
Мутантные потомства М ₅	289	1289	3:13	0,21
Умеренный уровень почвенного питания материнских растений				
с. Карельская	106	158	7:9	1,39
Мутантные потомства М ₅	814	1087	7:9	0,69
Низкий уровень почвенного питания материнских растений				
с. Карельская	60	158	4:12	1,8
Мутантные потомства М ₅	499	1468	4:12	1,6

Примечание. Критическое значение $\chi^2 = 3,84$ при $p < 0,05$.

Таблица 2. Вклад генетической и эпигенетической компонент изменчивости в формирование генетического груза у M_5 -потомств *F. pratensis* при десупрессии

Показатель	Уровень почвенного питания материнских растений		
	высокий	умеренный	низкий
<i>w-type</i>	0,15	0,41	0,31
Частота депигментированных проростков при десупрессии	0,85	0,59	0,69
<i>viridis</i> (V)	0,07	0,15	0,19
<i>xantha</i> (X)	0,65	0,41	0,47
<i>albina</i> (A)	0,13	0,03	0,03
Отсроченная десупрессия	0,02	0,02	0,05
Ранние ревертанты	0,10	0,01	0,12

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4 жирным шрифтом выделены наиболее высокие значения показателей.

Таблица 3. Вклад генетической и эпигенетической компонент изменчивости в восстановление пигментации 14-дневных проростков M_5 -мутантных потомств *F. pratensis*

Тип, механизм и скорость восстановления пигментации проростков	Уровень почвенного питания материнских растений		
	высокий	умеренный	низкий
Полное восстановление до <i>w-type</i>	0,08	0,16	0,07
Частичное восстановление	0,41	0,31	0,50
Отсутствие восстановления	0,51	0,53	0,43
Реверсия быстрая	0,18	0,35	0,13
Реверсия медленная	0,21	0,15	0,06
Репопуляция быстрая	0,10	0,01	0,12
Репопуляция медленная	0,51	0,49	0,69

почвенного питания материнских M_4 -растений. При умеренных условиях культивирования материнских растений наблюдается наибольшая частота (0,15) полного восстановления депигментированных проростков до *w-type* через медленную репопуляцию и быструю реверсию. Частота M_5 -проростков с полным восстановлением до *w-type* существенно ниже, чем с частичным восстановлением, в 7, 2 и 5 раз для низкого, умеренного и высокого фона соответственно (табл. 3). Около половины 14-дневных проростков характеризовались отсутствием восстановления пигментации (0,43; 0,53 и 0,51 на низком, умеренном и высоком фоне соответственно). Частота M_5 -проростков, восстановившихся через репопуляцию, преобладает над частотой проростков с реверсией. Максимальные различия в частоте (4 раза) характерны для проростков, сформировавшихся при низком уровне почвенного питания материнских растений. Восстановление через медленную репопуляцию преобладало над быстрой репопуляцией: различия наиболее выражены на умеренном фоне. Быстрая реверсия доминирует над медленной: различия наиболее выражены на умеренном и низком фоне (табл. 3).

Таким образом, выявлена сложная картина регуляции экспрессии мутантного гена и гена-супрессора, контролирующей температурозависимую супрессированную хлорофилл-дефектность у *F. pratensis*. У M_5 -мутантных потомств, находящихся в экстремальных условиях роста, наблюдается ослабление супрессии, если семена формировались при высоком уровне почвенного питания материнских растений по сравнению с умеренным или низким его уровнем. Восстановление функции гена-супрессора у потомства при ресупрессии также зависело от условий культивирования материнских растений. Полное восстановление депигментированных проростков до *w-type* и реверсия преобладали у M_5 -мутантных потомств, сформировавшихся при умеренном уровне почвенного питания материнских растений, а репопуляция – при высоком и низком его уровне.

Анализ изменчивости изученных показателей на основе сравнения компонент фенотипической дисперсии разных по составу комплексов позволил оценить влияние генетических, негенетических факторов и эффектов их взаимодействия. Трехфакторный дисперсионный анализ частоты депигментированных 10-дневных проростков M_5 -поколения *F. pratensis*, сформировавшихся из семян при различных уровнях почвенного питания материнских растений, показал, что доля влияния генетического фактора (действие мутантного гена) составила 0,76. Следующим по силе действия (0,14) является эффект взаимодействия генетического и негенетического (уровни почвенного питания материнских растений) факторов. Влияние негенетического фактора и еще одного генетического фактора (генетические особенности мутантных потомств) на частоту депигментированных проростков оказалось незначительным и составило 1,5 %. В условиях ресупрессии максимальное значение имело действие генетического фактора (эпистатическое действие мутантного гена и гена-супрессора) – 0,86.

Двухфакторный дисперсионный анализ частоты 10- и 14-дневных депигментированных проростков *F. pratensis* M_5 -поколения, выращенных при трех уровнях почвенного питания материнских растений (температура проращивания семян 35 °C (10 дней) и 25 °C (4 дня)), показал, что доля влияния генетического фактора (эпистатическое действие мутантного гена и гена-супрессора) выше при умеренном и низком фоне (соответственно 0,39 и 0,38) по сравнению с высоким (0,22). Влияние негенетического фактора (температура проращивания семян) наиболее выражено при умеренном фоне почвенного питания материнских растений (0,32). Эффект взаимодействия генетического и негенетического факторов в два раза выше (0,53) на высоком фоне по сравнению с умеренным и низким.

На фенотипическое выражение компонентов приспособленности (выживаемость и плодовитость) и действие элиминирующего отбо-

ра в M_5 -мутантных потомствах, сформировавшихся при различном уровне почвенного питания материнских растений, оказывают влияние и генетический (генетические особенности мутантных потомств), и негенетический (почвенное питание материнских растений) факторы. Большими отличиями характеризуются относительные значения компонентов приспособленности (выживаемость и плодовитость) растений M_5 -потомств (табл. 4).

Таблица 4. Генетическая и эпигенетическая составляющие изменчивости компонентов приспособленности M_5 -мутантных потомств *F. pratensis*

Показатель	Уровень почвенного питания материнских растений		
	высокий	умеренный	низкий
Выживаемость (общая / относительная)	0,21 / 0,70	0,25 / 0,82	0,23 / 0,98
Плодовитость (общая / относительная)	8683 / 0,79	8781 / 0,79	9435 / 1,05
Приспособленность	0,55	0,65	1,03
Действие элиминирующего отбора	0,45	0,35	0,16

Как показало исследование, стабилизирующий отбор контролирует пул депигментированных проростков M_5 -потомств. На рисунке 1 представлены линейные тренды, характеризующие отклонения частот фенотипов с депигментацией от средних значений у семи M_5 -мутантных потомств и в контрольной популяции (с. Карельская). Как правило, стабилизирующий отбор более интенсивен в отношении всех хлорофиллдефектных фенотипов, по сравнению с фенотипической нормой (зеленый фенотип), с характерными пологими линиями отклонений от среднего значения признака. Тем не менее выявились особенности действия отбора в отношении частоты растений с хлорофиллдефектным фенотипом при различном фоне почвенного питания материнских растений. Во всех вариантах опыта (высокий, умеренный и низкий уровень почвенного питания) в отношении особей с фенотипом *xantha* стабилизирующий отбор действует менее жестко, чем по отношению к фенотипам *albina* и *viridis*, а при высоком уровне – и по сравнению с *w-type*. У растений с фенотипом *viridis* стабилизация признака происходит при высоком, а с фенотипом *albina* – при низком и умеренном фоне почвенного питания. Высокий уровень почвенного питания сохраняет от действия отбора особи, которые формируют

потомство, характеризующееся высокими значениями частоты проростков с глубокими типами депигментации, – *xantha* и *albina*. Умеренный уровень почвенного питания растений создает наиболее жесткий селективный фон для всех хлорофиллдефектных фенотипов с соответствующими пологими линиями трендов.

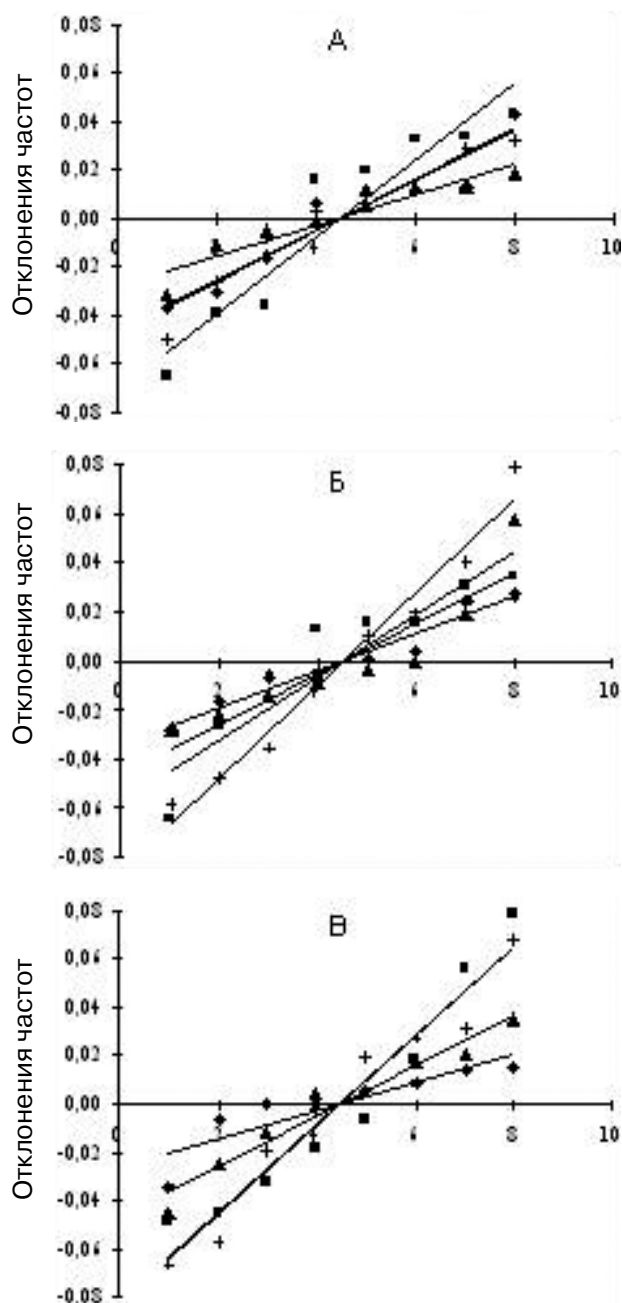


Рис. 1. Частота растений овсяницы луговой с супрессированной хлорофиллдефектностью в форме ранжированных отклонений от средней арифметической:

А, Б, В – соответственно высокий, умеренный и низкий фон почвенного питания; + – контроль; хлорофиллдефектные фенотипы: Δ – виридис, $\square$ – ксанта, $\diamond$ – альбина

Интенсивность действия стабилизирующего отбора в отношении компонентов выживаемости и плодовитости определялась как особенностями исследуемого признака, так и условиями почвенного питания материнских растений. Сильное давление естественного отбора (стабилизирующей его формы) проявляется в отношении фертильности пыльцы M_5 -мутантных потомств *F. pratensis* (умеренный и низкий уровень почвенного питания материнских растений), частоты проростков с размером более 2 см (высокий и умеренный уровень почвенного питания материнских растений) и массы 1000 семян (низкий уровень почвенного питания материнских растений). Менее интенсивно стабилизирующий отбор действует в отношении всхожести семян и массы семян на растение (рис. 2, 3).

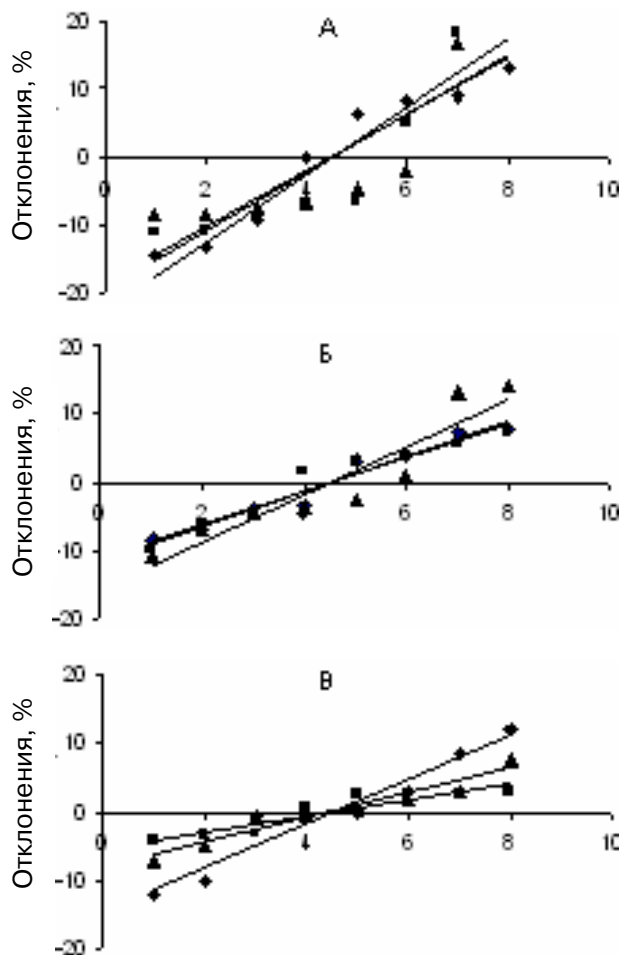


Рис. 2. Показатели выживаемости растений овсяницы луговой с супрессированной хлорофиллдефектностью в форме ранжированных отклонений от средней арифметической:

А – всхожесть, Б – частота проростков > 2, В – фертильность пыльцы; $\diamond$, $\square$, $\triangle$ – соответственно высокий, умеренный и низкий фон почвенного питания

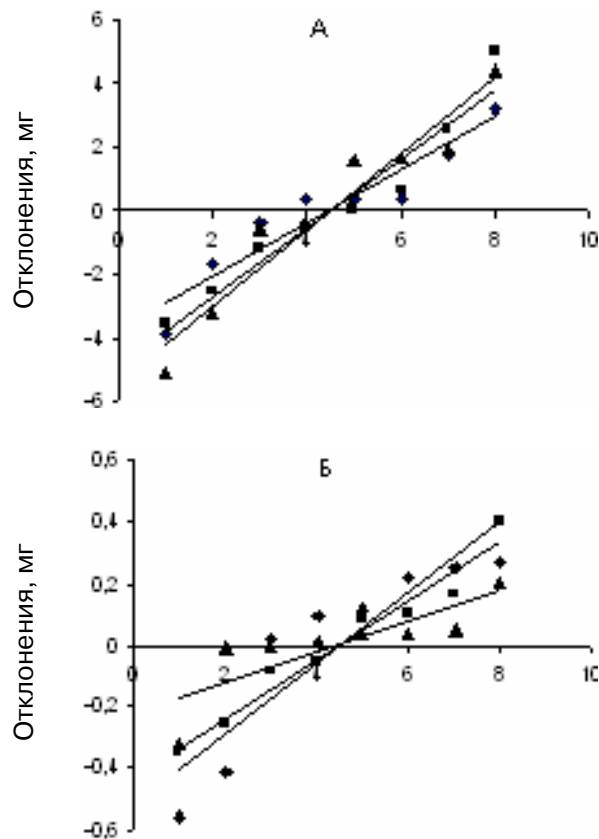


Рис. 3. Показатели продуктивности растений овсяницы луговой с супрессированной хлорофиллдефектностью в форме ранжированных отклонений от средней арифметической:

А – масса семян на растение, Б – масса 1000 семян; $\diamond$, $\square$, $\triangle$ – соответственно высокий, умеренный и низкий фон почвенного питания

Заключение

Проведенное исследование позволило выявить существенное влияние эпистатического действия мутантного гена и гена-супрессора на формирование генетического груза (величина пула проростков с супрессированной хлорофиллдефектностью) у M_5 -мутантных потомств *F. pratensis*, культивируемых при различных уровнях почвенного питания материнских растений. Эпигенетическая составляющая изменчивости величины генетического груза M_5 -мутантных потомств, компонентов их приспособленности определяется различными условиями почвенного питания материнских растений. Она проявляется как в изменении эффектов взаимодействия мутантного гена и гена-супрессора при де- и ресупрессии, так и в изменении степени давления естественного отбора (стабилизирующей его формы) на величину пула депигментированных проростков, выживаемость, плодовитость и приспособленность растений.

Литература

Голубовский М. Д. Век генетики: эволюция идей и понятий. СПб.: Борей Арт, 2000. 262 с.

Голубовский М. Д. Концепция эпигена 20 лет спустя // Биополимеры и клетка. 1996. Т. 12, № 4. С. 5–24.

Кирикович С. С., Левитес Е. В. Эпигенетика растений: сб. науч. тр. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2005. 264 с.

Кох О. Microsoft Excel 5.0. Санкт-Петербург.: BHV – Санкт-Петербург, 1994. 270 с. (Koch O. MS Excel 5.0. BHV – Verlag, 1994. 270 s.)

Лавров С. А., Мавродиев Е. В. Эпигенетическое наследование признаков и его возможная роль в микроэволюции растений // Журн. общ. биологии, 2003. Т. 64, № 5. С. 403–420.

Лебедева О. Н., Николаевская Т. С., Титов А. Ф., Федоренко О. М. Биологические особенности северных популяций многолетних злаков. Генетический груз и выживаемость // Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2012. 261 с.

Малецкий С. И., Левитес Е. В., Батурин С. О., Юданова С. С. Репродуктивная биология покрытосеменных растений. Генетический словарь. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2004. 106 с.

Оленов Ю. М. Эпигеномная изменчивость // Онтогенез. 1970 Т. 1, № 1. С. 11–16.

Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1974. 304 с.

Уоддингтон К. Х. Основные биологические концепции // На пути теоретической биологии. М.: Мир, 1970. С. 211–240.

Чураев Р. Н. Прикладные аспекты концепции эпигенов // Журн. общ. биологии. 1982. Т. 43, № 1. С. 79–87.

Чураев Р. Н. Элементы неканонической теории наследственности. Уфа: УНЦ РАН, 1997. 54 с.

Amedeo P., Habu Y., Afsar K. et al. Disruption of the plant gene *mom* releases transcriptional silencing of methylated genes // Nature. 2000. Vol. 405. P. 203–206.

Cocciolone S. M., Cone K. C. Pl-Bh, an anthocyanin regulatory gene of maize that leads to variegated pigmentation // Genetics. 1993. Vol. 135. P. 575–588.

Das O. P., Messing J. Variegated phenotype and developmental methylation changes of maize allele originating from epimutation // Genetics. 1994. Vol. 136. P. 1121–1141.

Holliday R., Pugh J. E. DNA modification mechanism and gene activity during development // Science. 1975. Vol. 178. P. 226–232.

Jablonska E., Lamb M. J. The inheritance of asquered epigenetic variations // Theor. Biol. 1989. Vol. 139. P. 69–83.

Jacobsen S. E., Meyerowitz E. M. Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in *Arabidopsis* // Science. 1997. Vol. 277. P. 1100–1103.

Martienssen R. A., Colot V. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi // Science. 2001. Vol. 293. P. 1070–1074.

Meyer P., Linn F., Heidmann L. et al. Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize *Al* gene construct in transgenic petunia and its color phenotype // Mol. Gen. Genet. 1992. Vol. 231. P. 345–352.

Richards E. DNA methylation and plant development // Trends Genet. 1997. Vol. 13. P. 319–323.

Vongs A., Kakutani T., Martienssen R. F., Richards E. *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants // Science. 1993. Vol. 260. P. 1926–1928.

Vyskot B. Epigenetic control of gene expression in plants // Vortr. Pflanzenzuchtung. 2000. H. 48. S. 297–304.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лебедева Ольга Николаевна

зам. директора по научной работе, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: lebedeva@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 774682

Николаевская Татьяна Сергеевна

старший научный сотрудник лаб. генетики, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nicoltn@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, руководитель лаб.
экологической физиологии растений,
чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769710, 762706

Lebedeva, Olga

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: lebedeva@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 774682

Nikolaevskaya, Tatiana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: nicoltn@mail.ru
tel.: (8142) 573107

Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: titov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769710, 762706

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 597.554.3:577.15:574.64

ВЛИЯНИЕ СВИНЦА НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ КИШЕЧНИКА РЫБ

И. Л. Голованова¹, Г. А. Урванцева²

¹Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН

²Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова

В экспериментах *in vitro* исследовано влияние ионов свинца Pb^{2+} в концентрации 0,01–25 мг/л на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб, различающихся по типу питания, – планктофага синца *Abramis ballerus* (L.), бентофагов леща *Abramis brama* (L.), плотвы *Rutilus rutilus* (L.), белоглазки *Abramis sapa* (Pallas) и ихтиофагов судака *Sander lucioperca* (L.) и сома *Silurus glanis* L. Показана низкая чувствительность гликозидаз к действию ионов свинца Pb^{2+} у исследованных видов рыб. Наибольший тормозящий эффект выявлен у леща, стимулирующий – у синца при концентрации ионов Pb^{2+} 25 мг/л.

К л ю ч е в ы е с л о в а: гликозидазы, пищеварение, рыбы, тяжелые металлы, свинец.

I. L. Golovanova, G. A. Urvantseva. EFFECTS OF LEAD ON GLYCOSIDASE ACTIVITY IN INTESTINAL MUCOSA IN FISH

The effects of *in vitro* exposure to lead ions Pb^{2+} at concentrations of 0.01–25 mg/l on the activity of intestinal mucosa glycosidases in fish with different feeding spectrum – planktophagous blue bream *Abramis ballerus* (L.), benthophagous bream *Abramis brama* (L.), roach *Rutilus rutilus* (L.), white-eye bream *Abramis sapa* (Pallas), ichthyophagous pikeperch *Sander lucioperca* (L.) and wels catfish *Silurus glanis* L. were investigated. Low sensitivity of glycosidases to the effect of lead Pb^{2+} in the investigated fish species was shown. The highest inhibitory effect was observed in bream, the highest stimulatory effect – in blue bream at the 25 mg/l concentration of Pb^{2+} ions.

Key words: glycosidases, digestion, fish, heavy metals, lead.

Введение

В настоящее время практически все водоемы загрязнены тяжелыми металлами, которые в отличие от органических загрязнителей

не подвергаются биodeградации, а лишь перераспределяются между компонентами экосистем. Они поступают в водную среду в результате антропогенного загрязнения либо из природных источников (при вымывании гор-

ных пород, эрозии почвы) и находятся в растворимой (или ионной), коллоидной (органической и неорганической) или взвешенной форме. Значительное количество тяжелых металлов накапливается в грунтах [Флеров и др., 2000; Светашова, 2011], которые могут быть вторичным источником загрязнения. Форма существования металлов может меняться в зависимости от pH среды и наличия растворенных органических веществ [Линник, Наби-ванец, 1986; Светашова, 2011]. Наибольшей биологической активностью, как правило, обладают ионные формы металлов либо их липофильные комплексы.

Свинец, наряду с ртутью, кадмием, медью и цинком, входит в группу самых распространенных и опасных в экотоксикологическом отношении элементов. При этом Cu и Zn – необходимые микроэлементы, в то время как Pb, Cd и Hg таковыми не являются. Значения ПДК свинца для воды водоемов рыбохозяйственного назначения составляет 6 мкг/л [Перечень..., 1999]. Он аккумулируется в различных тканях гидробионтов, а его содержание в мышцах и печени пресноводных рыб из районов техногенного загрязнения может достигать 2–15 мг/кг [Перевозников, Богданова, 1999; Nduka et al., 2006; Askary Sary, Mohammadi, 2012]. Высокие концентрации свинца отмечены в донных отложениях водоемов и в кормовых объектах рыб-бентофагов (дрейссена) [Перевозников, Богданова, 1999; Светашова, 2011]. Попадая в организм рыб вместе с водой и пищей, он может оказывать прямое и опосредованное действие на активность ферментов пищеварительного тракта рыб. Углеводы являются важным энергетическим и пластическим компонентом пищи. Их содержание в кормовых объектах рыб планктофагов, бентофагов и особенно макрофитофагов значительно выше, чем у типичных ихтиофагов [Остроумова, 2001]. У рыб с более высоким содержанием углеводов в естественной пище отмечена и более высокая активность пищеварительных гликозидаз [Уголев, Кузьмина, 1993]. Ранее в экспериментах *in vitro* установлено изменение активности кишечных гликозидаз в присутствии ионов Cd^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} у ряда видов пресноводных рыб, различающихся по типу питания [Golovanova et al., 1999; Филиппов, Голованова, 2010]. Однако действие ионов свинца Pb^{2+} на активность пищеварительных ферментов рыб практически не исследовано.

Цель данной работы – изучить *in vitro* влияние ионов свинца в концентрации 0,01–25 мг/л на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб, различающихся по типу питания.

Материалы и методы

Объекты исследования – половозрелые особи шести видов рыб: планктофаг синец *Abramis ballerus* (L.), бентофаги лещ *Abramis brama* (L.), плотва *Rutilus rutilus* (L.), белоглазка *Abramis sapa* (Pallas), ихтиофаги судак *Sander lucioperca* (L.) и сом *Silurus glanis* L. Рыбы (по 8 экз. леща и плотвы, по 6 экз. белоглазки и синца, 5 экз. судака и 4 экз. сома) отловлены в весенний период 2012–2013 гг.: лещ (масса 1200 ± 130 г), плотва (302 ± 50 г), судак (1400 ± 60 г), сом (12220 ± 260 г) – в Волжском плесе Рыбинского водохранилища (март–апрель), белоглазка (200 ± 11 г) и синец (222 ± 26 г) – в устье р. Ветлуги (первая декада мая). После поимки рыб обездвиживали, сразу извлекали кишечники, которые хранили при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более двух недель.

В лабораторных условиях кишечники очищали от жира и прилегающих тканей. Активность гликозидаз (мальтаза, амилалитическая активность) определяли в гомогенатах слизистой оболочки медиального отдела кишечника, предварительно освобожденного от химуса. При помощи стеклянного гомогенизатора готовили суммарные пробы (в состав которых входила слизистая от 4–8 экз. рыб одного вида), добавляя охлажденный до $2\text{--}4\text{ }^{\circ}\text{C}$ раствор Рингера для холоднокровных животных (110 мМ NaCl, 1,9 мМ KCl, 13 мМ CaCl_2 , pH 7,4) в соотношении 1:9. Затем исходные гомогенаты дополнительно разводили раствором Рингера в 2–10 раз. Растворы субстратов (растворимый крахмал в концентрации 18 г/л и мальтоза в концентрации 50 ммоль/л) готовили на таком же растворе Рингера. Для оценки влияния свинца на активность гликозидаз в пробирки приливали 0,25 мл гомогената и 0,25 мл раствора азотнокислой соли свинца $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ в концентрации 0,01; 0,1; 1; 5; 10 и 25 мг/л (в расчете на содержание ионов металла). В контроле вместо соли добавляли равное количество раствора Рингера. Содержимое пробирок инкубировали при температуре $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7,4 в течение 1 часа при непрерывном перемешивании. Затем в каждую пробирку добавляли 0,5 мл субстрата и вновь инкубировали в течение 20–60 мин при тех же условиях. Выбор диапазона концентраций обусловлен значениями ПДК свинца и его содержанием в тканях рыб и кормовых объектов [Перевозников, Богданова, 1999; Перечень..., 1999; Светашова, 2011; Соболев, 2006].

Активность гликозидаз определяли на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin&Elmer, США) при 505 и 670 нм. Для определения активности

мальтазы КФ 3.2.1.20 применяли набор для клинической биохимии «Фотоглюкоза» (ООО «Импакт», Россия). Амилолитическую активность (отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал, – α -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы) оценивали по приросту гексоз модифицированным методом Нельсона [Уголев и др., 1969]. Ферментативную активность определяли в пяти повторностях для каждой точки с учетом фона (количества конечных продуктов реакции в исходном гомогенате) и выражали в микромолях продуктов реакции, образующихся за 1 мин инкубации в расчете на 1 г влажной массы ткани (мкмоль/г·мин).

Результаты обработаны статистически с помощью программы Statistica 10.0 и представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). Сравнительный анализ полученных данных проводили с помощью непараметрического критерия Краскала–Уоллиса. Порог доверительной вероятности при оценке достоверности различий принят равным 0,95.

Результаты и обсуждение

Уровень активности гликозидаз в слизистой оболочке кишечника леща и плотвы в 1,5–6,0 раза выше, чем у судака и сома (табл.). Еще более высокая активность гликозидаз у синца и белоглазки обусловлена не столько видовыми особенностями, сколько наличием пищи (в кишечнике присутствовал химус), в то время как у других исследованных видов рыб кишечника были пусты. Это предположение хорошо согласуется с представлениями о стимулирующем действии пищевых субстратов на активность пищеварительных ферментов [Уголев, 1972].

Амилолитическая активность у леща снижается на 18 и 27 % от контроля в присутствии ионов свинца Pb^{2+} в концентрации 10 и 25 мг/л. У других исследованных видов достоверных эффектов не обнаружено. Изменение активности мальтазы отмечено лишь при наибольших концентрациях металла: снижение на 29 и 30 % у леща, повышение на 23 и 73 % у синца и на 26 % от контроля у судака.

Ранее было показано, что амилолитическая активность в гомогенатах слизистой оболочки кишечника у десяти видов рыб Рыбинского водохранилища, в том числе леща, плотвы, синца и судака, отловленных в зимний период, практически не изменяется при *in vitro* действии ионов кадмия Cd^{2+} в концентрации 0,1–25 мг/л [Golovanova et al., 1999]. Снижение ферментативной активности на 22 % отмечено лишь у налима при концентрации ионов Cd^{2+} 25 мг/л. При более высокой концентрации ионов Cd^{2+} 50 мг/л амилолитическая активность снижалась у налима, карася и карпа на 23, 26 и 29 % соответственно. Активность собственно мембранного фермента сахаразы достоверно снижалась на 33 % от контроля лишь у планктофага синца при концентрации ионов Cd^{2+} 50 мг/л [Golovanova et al., 1999].

Сравнительный анализ действия ионов свинца Pb^{2+} и кадмия Cd^{2+} на активность пищеварительных гликозидаз слизистой оболочки кишечника пресноводных рыб позволяет предположить большую чувствительность ферментов рыб бенто- и планктофагов по сравнению с типичными ихтиофагами к действию неэссенциальных металлов. Гликозидазы плотвы более устойчивы к действию свинца, по сравнению с лещом, что может быть связано с большим количеством тяжелых металлов

Активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб в присутствии ионов свинца Pb^{2+}

Концентрация ионов Pb^{2+} , мг/л	Вид рыб					
	Лещ	Плотва	Судак	Сом	Белоглазка	Синец
Амилолитическая активность, мкмоль/г·мин						
Контроль (0)	1,55 ± 0,01	2,75 ± 0,12	1,01 ± 0,02	0,46 ± 0,02	16,96 ± 0,66	6,29 ± 0,25
0,01	1,40 ± 0,02	3,47 ± 0,06	0,99 ± 0,01	0,47 ± 0,03	16,32 ± 0,64	5,23 ± 0,22
0,1	1,40 ± 0,02	2,48 ± 0,03	1,07 ± 0,02	0,52 ± 0,03	15,36 ± 0,74	5,97 ± 0,11
1	1,35 ± 0,02	2,80 ± 0,04	0,98 ± 0,01	0,52 ± 0,03	18,12 ± 0,56	6,35 ± 0,10
5	1,44 ± 0,02	2,43 ± 0,05	1,05 ± 0,02	0,51 ± 0,02	18,61 ± 0,46	6,13 ± 0,24
10	1,27 ± 0,01**	2,45 ± 0,03	0,92 ± 0,01	0,52 ± 0,03	21,01 ± 0,26	6,24 ± 0,23
25	1,13 ± 0,02***	2,72 ± 0,07	0,86 ± 0,01	0,54 ± 0,03	20,85 ± 0,24	6,13 ± 0,25
Активность мальтазы, мкмоль/г·мин						
Контроль (0)	3,26 ± 0,09	6,11 ± 0,20	2,23 ± 0,02	0,54 ± 0,04	23,26 ± 0,10	10,51 ± 0,23
0,01	3,22 ± 0,13	6,13 ± 0,22	2,22 ± 0,02	0,61 ± 0,05	22,40 ± 0,13	11,42 ± 0,49
0,1	3,23 ± 0,07	6,74 ± 0,12	2,20 ± 0,03	0,65 ± 0,04	23,28 ± 0,32	11,84 ± 0,14
1	2,75 ± 0,10	5,95 ± 0,24	2,22 ± 0,02	0,56 ± 0,02	24,30 ± 0,24	12,12 ± 0,22
5	2,29 ± 0,03	6,31 ± 0,26	2,35 ± 0,03	0,59 ± 0,03	24,55 ± 0,51	12,41 ± 0,30**
10	2,28 ± 0,02*	7,08 ± 0,15	2,51 ± 0,01	0,53 ± 0,02	24,51 ± 0,27	12,89 ± 0,15*
25	2,31 ± 0,03*	6,37 ± 0,13	2,80 ± 0,01*	0,64 ± 0,03	24,61 ± 0,44	18,17 ± 0,50***

Примечание. Приведены средние значения показателей и их ошибки ($M \pm m$); различия показателей по сравнению с контролем статистически достоверны: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,001$.

в ее естественной пище. Действительно, в питании пойменно-придонной экологической группы плотвы преобладает дрейссена, в тканях которой зарегистрирован высокий уровень содержания тяжелых металлов, в том числе и свинца [Соболев, 2006; Светашова, 2011]. Повышение активности мальтазы у синца и судака в присутствии свинца объяснить труднее. Разнонаправленные эффекты ионов свинца Pb^{2+} на активность одноименных ферментов могут быть обусловлены не только типом питания рыб и биохимическим составом пищи, но и разным функциональным состоянием пищеварительной системы (сытость–голод), как это было показано на примере действия ионов Cd^{2+} на активность гликозидаз у леща [Golovanova et al., 1994, 1999].

Общее неспецифическое действие тяжелых металлов заключается в блокировании ими различных биохимических реакций посредством связывания функциональных –SH групп ферментов или вытеснения микроэлементов из активных центров. Поскольку существует несколько изоформ α -амилазы, глюкоамилазы и мальтазы, нельзя исключить и молекулярную разнокачественность ферментов рыб разных экологических групп. Сила и направленность эффектов могут быть обусловлены разным влиянием свинца на панкреатические и собственно кишечные ферменты, разным содержанием свинца в пище [Светашова, 2011], а также уровнем его накопления в тканях, который отличается у рыб разных видов [Nduka et al., 2006; Alipour et al., 2013] и зависит от сезона года [Coulibaly et al., 2012]. Поскольку изменения физиолого-биохимических показателей могут свидетельствовать о нарушениях в обмене веществ задолго до появления видимых отклонений от нормы, изучение чувствительности ферментов к действию токсических веществ необходимо для ранней диагностики состояния здоровья рыб.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о низкой чувствительности гликозидаз (мальтазы и амилазной активности) слизистой оболочки кишечника исследованных видов рыб, различающихся по типу питания, к действию *in vitro* ионов свинца Pb^{2+} в концентрации 0,01–25 мг/л. Достоверные эффекты выявлены лишь при самых высоких концентрациях металла: наибольший тормозящий эффект – у леща, стимулирующий – у синца. Гликозидазы плотвы, сома и белоглазки нечувствительны к действию ионов свинца Pb^{2+} *in vitro*.

Литература

- Линник Л. П., Набиванец Б. И. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. Л.: Гидрометеиздат, 1986. 270 с.
- Остроумова И. Н. Биологические основы кормления рыб. 2001. СПб.: ГосНИОРХ, 372 с.
- Перевозников М. А., Богданова Е. А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах. СПб.: Гос. науч.-исслед. ин-т озер. и реч. хоз-ва. 1999. 228 с.
- Перечень рыбохозяйственных нормативов: предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. М.: Всерос. науч.-исслед. ин-т рыб. хоз-ва и океанографии. 1999. 304 с.
- Светашова Е. С. К вопросу накопления тяжелых металлов в водных экосистемах // Экологические проблемы пресноводных рыбохозяйственных водоемов России. Всерос. науч. конф. с междунар. участием. Казань. 2011. С. 371–375.
- Соболев К. Д. Загрязнение тяжелыми металлами естественных и искусственных кормов и его влияние на рыб в условиях сбросных теплых вод // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2006. 24 с.
- Уголев А. М., Кузьмина В. В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеиздат, 1993. 238 с.
- Уголев А. М. Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция. Л.: Наука, 1972. 358 с.
- Уголев А. М., Иезуитова Н. Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека. Л.: Наука, 1969. С. 192–196.
- Филиппов А. А., Голованова И. Л. Раздельное и совместное влияние меди и цинка *in vitro* на активность карбогидраз кишечника пресноводных костистых рыб // Биология внутр. вод. 2010. № 1. С. 104–109.
- Флеров Б. А., Томилина И. И., Кливленд Л. и др. Комплексная оценка состояния донных отложений Рыбинского водохранилища // Биология внутр. вод. 2000. № 2. С. 148–155.
- Alipour H., Pourkhabbaz A., Hassanpour M. Assessing of heavy metal concentrations in the tissue of *Rutilus rutilus caspicus* and *Neogobius gorlap* from Miankaleh international wetland // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2013. Vol. 91, N 5. P. 517–521.
- Askary Sary A., Mohammadi M. Lead bioaccumulation and toxicity in tissue of economically fish species from river and marine water // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2012. Vol. 89, N 1. P. 82–85.
- Coulibaly S., Atse B. C., Koffi K. M., Sylla S., Konan K. J., Kouassi N. J. Seasonal accumulation of some heavy metals in water, sediment and tissue of black-chinned tilapia *Sarotherodon melanocheilus* from Biétri Bay in Ebrié Lagoon, Ivory Coast // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2012. Vol. 88, N 4. P. 571–576.
- Golovanova I. L., Chuiko G. M., Pavlov D. F. Effects of cadmium, Naphthalene and DDVP on Gut Carbohydrases Activity in Bream (*Abramis brama* L.) and Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1994. Vol. 52, N 3. P. 338–345.

Golovanova I. L., Kuz'mina V. V., Gobzhel'ian T. E., Pavlov D. F., Chuiko G. M. In vitro effects of cadmium and DDVP (Dichlorvos) on intestinal carbohydrase and protease activities in freshwater teleost // Comp. Biochem. Physiol. 1999. Vol. 122 C, N 1. P. 21–25.

Nduka J. K. C., Constance E., Obiakor E. Selective bioaccumulation of metals by different parts of some fish species from crude oil polluted water// Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2006. Vol. 77, N 5. P. 846–853.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Голованова Ирина Леонидовна

главный научный сотрудник
ИБВВ им. И. Д. Папанина РАН
Борок, Ярославская обл.,
Некоузский р-н, Россия, 152742
эл. почта: golovanova5353@mail.ru
тел.: (485) 4724484

Урванцева Галина Александровна

доцент
Ярославский государственный
университет им. П. Г. Демидова
ул. Советская, д. 14, г. Ярославль, Россия, 150000
эл. почта: urvga@mail.ru
тел.: (485) 2474617

Golovanova, Irina

I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters,
Russian Academy of Sciences
152742 Borok, Yaroslavl Region, Russia
e-mail: golovanova5353@mail.ru
tel.: (485) 4724484

Urvantseva, Galina

P. G. Demidov Yaroslavl State University
14 Sovetskaya St., 150000 Yaroslavl, Russia
e-mail: urvga@mail.ru
tel.: (485) 2474617

УДК 577.175.82:591.16:599.323.4

ВОСПРОИЗВОДСТВО И ПОЛОВОЕ СОЗРЕВАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОСТОЯННОЙ ТЕМНОТЫ

**Е. А. Хижкин¹, В. Д. Юнаш², В. А. Илюха^{1,2}, И. А. Виноградова²,
А. В. Морозов¹, Н. Г. Тимейко²**

¹Институт биологии Карельского научного центра РАН

²Петрозаводский государственный университет

Исследованы эффекты искусственного усиления секреторной функции эпифиза, вызванного воздействием световой депривации, на показатели воспроизводства крыс и темпы их развития в постнатальном онтогенезе. Специфический световой режим оказывал модулирующее влияние на изученные показатели, но степень влияния зависела от того, на каком этапе онтогенеза начиналось его воздействие. Содержание самок в период беременности при постоянной темноте приводило к повышению смертности потомства при рождении и в течение первого месяца жизни, задержке физического развития (более позднее по сравнению с крысятами, рожденными в условиях других световых режимов, открытие глаз) и полового созревания самцов и самок.

К л ю ч е в ы е с л о в а: фотопериод, постоянная темнота, мелатонин, воспроизводство, половое созревание.

**E. A. Khizhkin, V. D. Yunash, V. A. Ilyukha, I. A. Vinogradova,
A. V. Morozov, N. G. Timeyko. REPRODUCTION AND PUBERTY IN RATS
EXPOSED TO CONSTANT DARKNESS**

The effect of artificial enhancement of the pineal gland secretory function, caused by light deprivation on the reproduction indices of rats and their rate of development in postnatal ontogenesis was investigated. Specific light conditions modulated the studied indices, yet the extent of the impact depended on the stage of ontogenesis in which the impact began. Exposure to constant darkness during the gestation period resulted in an increase in pups mortality at birth and during the first month of life. In addition, a delay in physical development (later eye opening compared with pups born under other light modes) and sexual maturation of male and female pups was observed.

Key words: photoperiod, constant darkness, melatonin, reproduction, puberty.

Введение

Свет является важным экологическим фактором, исследованию влияния которого на различные физиологические функции животных уделяется все больше внимания [Ани-

симов и др., 2012]. В то же время в литературе имеются лишь незначительные упоминания о влиянии темноты на организм животных. Большинство из них описывают влияние укороченного фотопериода на суточные из-

менения поведения и репродуктивную функцию преимущественно диких и сельскохозяйственных животных [Beery et al., 2008; Walton et al., 2011]. Такое воздействие света на организм осуществляется посредством нейро-эндокринного органа эпифиза и его гормона мелатонина, синтез которого подчинен суточной и сезонной периодичности. Сезонные изменения продолжительности дня являются одним из условий контроля пубертатного развития – сокращение длительности светового дня после летнего солнцестояния тормозит половое созревание как у самцов, так и у самок мелких грызунов [Butler et al., 2007a, b]. Исследования эффектов смены дня и ночи на мелких млекопитающих проводятся с использованием взрослых особей, хотя не менее важным является фотопериод на ранних стадиях онтогенеза и даже в пренатальный период, так как в это время определяется траектория индивидуального развития животных [Bronson, 1985]. У многих видов грызунов короткий день в период рождения тормозит репродуктивное развитие в первые несколько месяцев жизни (белоногая мышь [Johnston, Zucker, 1980], оленья мышь [Whitsett et al., 1984], сибирский хомяк [Hoffmann, 1978], луговая полевка [Dark et al., 1990], горная полевка [Horton, 1984], обыкновенная полевка [Craven, Clarke, 1982], кузнечиковая мышь [Frost, Zucker, 1983], рисовая болотная крыса [Edmonds, Stetson, 1995], турецкий хомяк [Hong, Stetson, 1986]). Однако у самок и самцов хомяков, родившихся в условиях короткого дня, быстро восстанавливается репродуктивное развитие при содержании их в длинном фотопериоде [Weil et al., 2006]. У самок хомяков, помещенных в короткий день, наблюдается замедление развития яичников, которое приводит к усилению фертильности в зрелом возрасте, преимущественно в связи с сохранением большего числа примордиальных фолликулов [Kabitha, Place, 2008]. Самцы сирийских хомячков, матери которых помещались в условия короткого дня, имели меньший размер семенников, чем те, матери которых находились в период беременности при длинном световом дне [Beery et al., 2008].

Эффекты фотопериода в раннем онтогенезе не ограничиваются только репродуктивной системой. Самцы луговой полевки, помещенные в условия короткого дня, имели во взрослом состоянии массу мозга меньшую по сравнению с теми, кто был помещен в длинный световой день [Dark et al., 1987]. Раннее удаление пинеальной железы ослабляло антитело-зави-

симую клеточную цитотоксичность и задерживало развитие тимуса у грызунов [Csaba, Barath, 1975; Vermeulen et al., 1993], а введение мелатонина *in ovo* усиливало клеточный и гуморальный иммунный ответ у домашних кур [Moore, Siopes, 2005].

Цель настоящей работы – исследовать влияние усиления мелатонинсекретирующей функции пинеальной железы постоянной темнотой на показатели воспроизводства, темпы развития и скорость полового созревания крыс в зависимости от периода начала экспериментального воздействия.

Материалы и методы

Исследования выполнены с использованием приборно-аналитической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

В исследовании на крысах сток Вистар было проведено экспериментальное моделирование физиологической гиперфункции эпифиза, вызванной воздействием постоянной темноты в период беременности самок крыс и с момента рождения потомства. Самки в период беременности находились при стандартном освещении (12:12, LD) и постоянной темноте (DD). Потомство от самок первой группы после рождения было разделено на две подгруппы и оставлено в стандартном (LD) освещении или помещено в постоянную темноту (LD/DD). Потомство от самок группы DD содержали в том же световом режиме, что и их матерей во время беременности, – при постоянной темноте (DD/DD).

Регистрировали сроки наступления беременности самок крыс, физиологическое состояние самок после периода выкармливания, уровень рождаемости и смертности потомства, показатели развития крысят (динамику отлипания ушных раковин, появления первичного волосяного покрова, открытия глаз), массу тела беременных самок и их потомства, сроки полового созревания крыс (самцов – по опусканию семенников, самок – по раскрытию влагалища).

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики, достоверность различий между группами оценивали на основании непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Все манипуляции при проведении эксперимента выполнены с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным [Этическая экспертиза..., 2005].

Результаты и обсуждение

Для размножения содержащихся в стандартных световых условиях крыс (LD) помещали группами (1 самец + 5 самок) в клетки, находящиеся в тех же световых условиях или в условиях постоянной темноты (DD). Несмотря на то что все экспериментальные животные были ссажены одновременно и роды у всех самок, содержащихся в условиях LD и DD режимов, начались в один день (19.11.2013), нами были выявлены некоторые особенности динамики этого процесса в зависимости от условий освещения, в которых находились крысы. Установлено, что в группе самок, содержащихся все время беременности в темноте, роды проходили менее интенсивно по сравнению с самками из стандартного освещения. К пятнадцатым суткам после первых родов в режиме DD количество крыс, принесших потомство, составляло 60 % от всех самок этой группы (рис. 1). В стандартном световом режиме к пятнадцатым суткам родили 80 % самок. Несмотря на это, в обеих экспериментальных группах роды завершились в один день (10.12.2013).

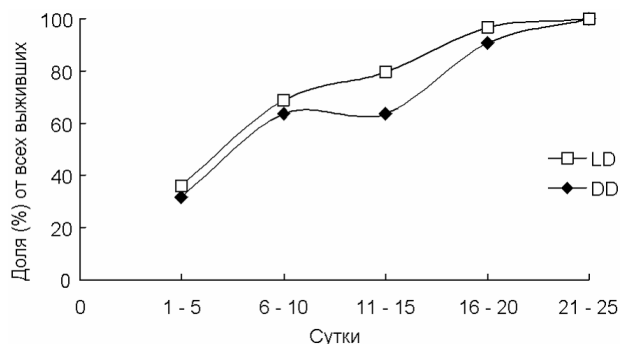


Рис. 1. Динамика родов самок в различных световых условиях. Здесь и далее: LD – стандартное освещение, DD – постоянная темнота

Очевидно, содержание в постоянной темноте повлияло на протекание беременности крыс. Примечательно, что в этих световых условиях самок, принесших в помете более 15 крысят, было в полтора раза больше, чем при регулярно чередующемся освещении (рис. 2). С другой стороны, в условиях постоянной темноты число самок, не принесших приплода, в 2,7 раза превышало количество таковых, находившихся в группе со стандартным освещением.

В ходе эксперимента было установлено, что число родившихся крысят на одну самку не различалось в стандартных световых условиях и в темноте (рис. 3, А). При этом в условиях постоянной темноты количество мертворожденных

ных крысят более чем в два раза превышало аналогичный показатель в стандартном освещении. На момент отсадки потомства от самок (25 дней после рождения) в группе DD/DD количество выживших животных было несколько ниже, чем в стандартном освещении (рис. 3, Б). Это свидетельствует о более низкой выживаемости животных, рожденных самками, находившимися в период беременности при световой депривации.

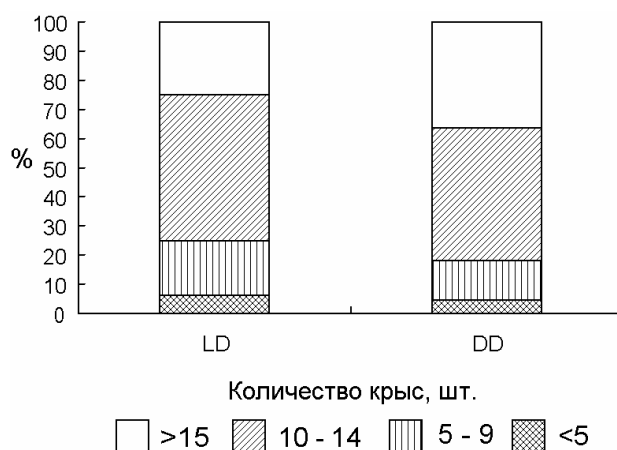


Рис. 2. Распределение самок по количеству крысят в помете при различных световых режимах

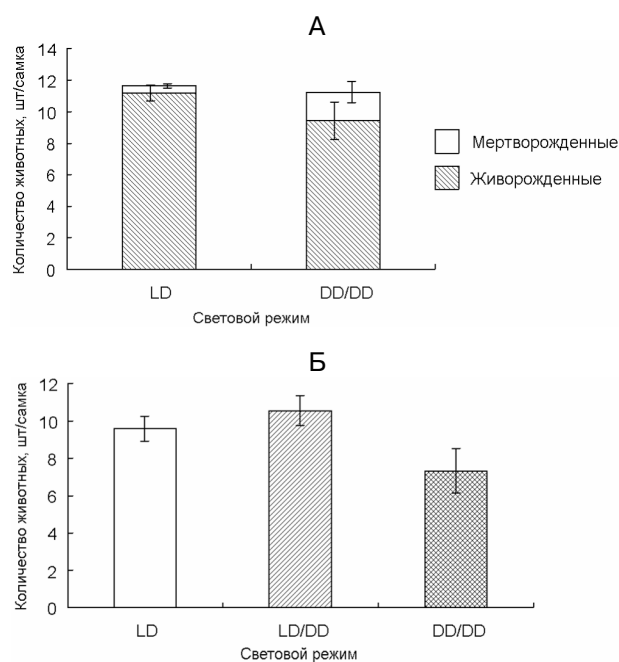


Рис. 3. Количество рожденных (А) и выживших к моменту отсадки от самки крысят (Б) при различных световых режимах ($M \pm m$)

Здесь и на рисунках 4, 5: LD/DD – беременные самки содержались при стандартном освещении, а рожденные ими крысят – при постоянной темноте, DD/DD – беременные самки и рожденные ими крысят содержались при постоянной темноте

Исследование физиологического состояния самок после лактации (помет каждой самки состоял в среднем из 15 крысят) позволило выявить у них по сравнению с нерожавшими тенденцию к снижению уровня общего белка плазмы во всех световых режимах и уровня лейкоцитов крови в группе DD/DD. Кроме того, отмечено достоверное снижение массы тела самок, рожавших в стандартном освещении и выкармливавших потомство в темноте, по сравнению с рожавшими самками в группе LD (рис. 4).

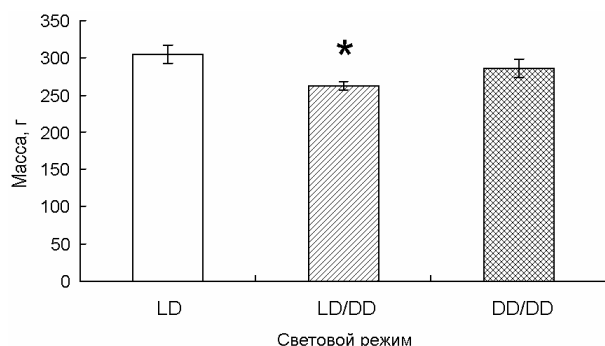


Рис. 4. Масса самок крыс к моменту отсадки от них потомства при различных световых режимах ($M \pm m$)

* – изменения достоверны по сравнению с самками, содержавшимися в стандартном режиме освещения

Содержание новорожденных крысят в специфических световых условиях сказывалось на их развитии. Открытие глаз проходило интенсивнее у крысят, помещенных в темноту сразу после рождения (LD/DD), тогда как животные, матери которых в период беременности и они сами с момента рождения содержались в условиях световой депривации (DD/DD), демонстрировали снижение темпов открытия глаз (рис. 5, А). Появление первичного волосяного покрова проходило более ускоренно в группах LD/DD и DD/DD. Значительных различий в динамике отлипания ушных раковин не выявлено.

Половое созревание у самцов, содержащихся в стандартных световых условиях (LD) и при постоянной темноте с рождения (LD/DD), отмечалось уже на 21-й, а заканчивалось на 31-й день жизни, что соответствует физиологическим нормам (рис. 5, Б). В режиме DD/DD опускание семенников у самцов начиналось на два дня позже, но заканчивалось к 31-м суткам, как и в двух других группах. Половое созревание самок в группах с постоянной темнотой, независимо от момента начала ее воздействия, задерживалось на два дня по сравнению с аналогичным процессом при стандартном световом режиме. Примечательно, что в группе LD и LD/DD раскрытие влагалища у самок завершалось к 59-му, а в DD/DD световых ус-

ловиях – к 61-му дню жизни крыс (рис. 5, В). Следует отметить, что во всех режимах освещения сроки полового развития и самцов и самок существенно не отличались от физиологической нормы, характерной для этого вида.

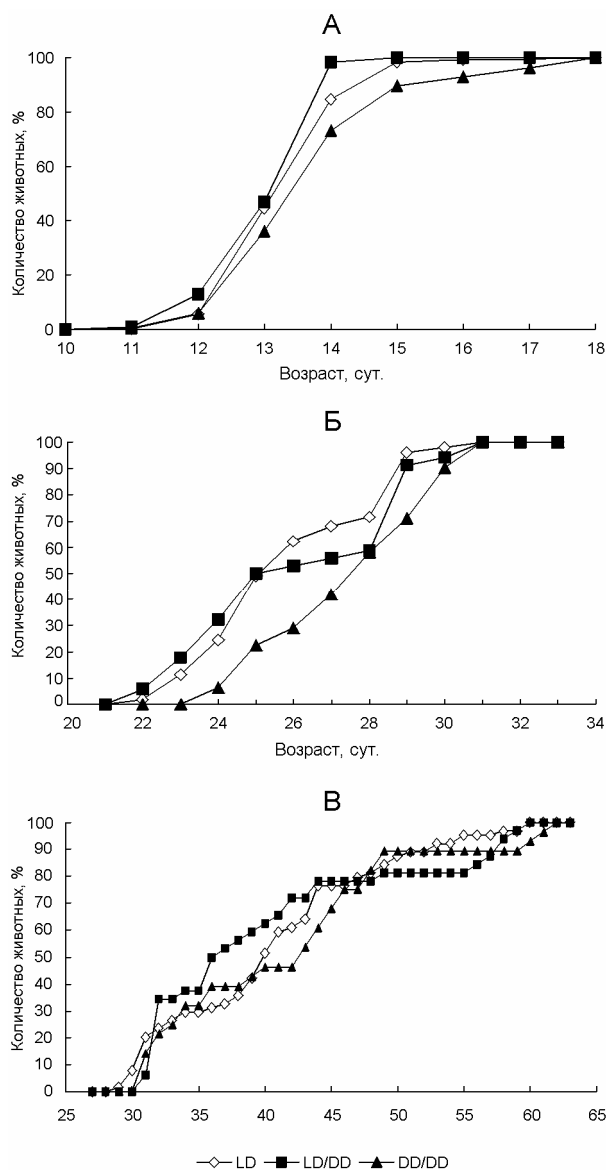


Рис. 5. Динамика развития крыс в раннем постнатальном онтогенезе при различных световых режимах:

А – открытие глаз у крысят, Б – половое созревание самцов, В – половое созревание самок

По нашему мнению, выявленные эффекты постоянной темноты на показатели воспроизводства и темпы физического и пубертатного развития связаны прежде всего с повышением функциональной активности эпифиза и индукцией синтеза мелатонина железой. Этот гормон играет существенную роль в регуляции полового созревания, репродуктивных циклов, стрессорной реакции и многих других физиологиче-

ских процессов [Anisimov, 2006]. В литературе имеются сведения, что информация о фотопериоде, в котором содержатся самки во время беременности и лактации, передается плоду через плаценту и в дальнейшем с молоком матери [Stetson et al., 1986]. Не исключается, что материнская pineальная железа может посредством гормона мелатонина оказывать влияние на развитие плода и половое созревание потомства. Было выявлено [Bishnupuri, Haldar, 2000], что изменение световых режимов (постоянное освещение, постоянная темнота, длинный и короткий фотопериод) у индийских пальмовых белок на ранних этапах беременности (до 30-го дня) приводило к резорбции или гибели эмбрионов. Однако изменение светового режима на более поздних стадиях (от 30 дней) не влияло на протекание беременности, и рождалось здоровое потомство.

В нашем исследовании выраженность развивающихся изменений у потомства при постоянной темноте зависела от того, в какой период онтогенеза начиналось воздействие. Несмотря на то что крыс относят к сумеречным и даже ночным животным, отсутствие суточного чередования дня и ночи при постоянной темноте в период эмбрионального развития (искусственное физиологическое усиление секреторной функции эпифиза) вызывало повышение смертности крысят при рождении и в течение первого месяца жизни. При этом динамика родов у самок в условиях световой депривации была изменена по сравнению с крысами в стандартном световом режиме. Следует отдельно отметить, что из 25 крыс в группе DD не принесли помет четыре самки, при том что в группе LD из 68 таких была только одна.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о негативном эффекте нарушения фотопериода на физиологическое состояние животных. Отмечается, что постоянная темнота, вызывающая наибольший по сравнению с другими режимами фотопериодический стресс, приводит к снижению накопления абдоминального жира и массы тела у самок индийских пальмовых белок в период лактации [Bishnupuri, Haldar, 2000]. В нашем эксперименте также было отмечено достоверное снижение массы тела самок, находившихся весь период беременности в стандартном освещении, но выкармливавших потомство в темноте, по сравнению с самками группы LD. Считается, что жир, накопленный самками в течение беременности, метаболизируется в период лактации в качестве энергетического субстрата для секреции молока [Innes, Millar, 1981]. С учетом этого выявленное снижение массы самок по-

сле выкармливания потомства в условиях световой депривации может являться причиной более интенсивной утилизации жира в процессе секреции молока.

Изменение фотопериода на поздних этапах беременности самок нарушает рост и половое развитие потомства [Johnston, Zucker, 1980; Whitsett et al., 1984; Bishnupuri, Haldar, 2000]. Нами показано, что у крысят, выращенных самками в темноте, наблюдалась задержка физического развития (более позднее по сравнению с крысятами в других световых режимах открытие глаз) и полового созревания самцов и самок. Этот феномен может быть рассмотрен как результат переноса фотопериодической информации от матери к плоду, так как в период внутриутробного развития при изменении светового режима нарушается эндогенный ритм синтеза мелатонина именно у самок [Horton et al., 1990; Davis, 1997].

Настоящее исследование, а также выявленные в предыдущих работах особенности полового созревания у крыс при воздействии различных световых условий, начиная с пренатального периода, с момента рождения и с 25-дневного возраста [Хижкин и др., 2013], подтверждают значительную роль эпифиза (его функциональной активности) и мелатонина в становлении репродуктивной функции. Отсутствие фотопериодичности при двух контрастных световых режимах (постоянное освещение и постоянная темнота), противоположно влияющих на синтез мелатонина эпифизом, оказывают разнонаправленные эффекты на постнатальное развитие крыс. При этом различные сроки воздействия световой депривации и постоянного освещения модулируют половое созревание как самцов, так и самок крыс. Нахождение животных с момента рождения и в период внутриутробного развития в темноте способствует несколько замедленному, а при постоянном освещении ускоренному становлению половой функции, нежели у крыс в группе со стандартным освещением. Вместе с этим световая депривация, воздействие которой начиналось с 25-дневного возраста, значительно замедляет половое созревание самцов крыс, а постоянное освещение, напротив, ускоряет его.

Заключение

Таким образом, показаны эффекты воздействия постоянной темноты, вызывающей индукцию синтеза мелатонина эпифизом, на воспроизводство лабораторных крыс и развитие их потомства в постнатальном онтогенезе в зависимости от сроков световой депривации

(с момента эмбрионального развития и с момента рождения детенышей). Гипо- и гиперфункция эпифиза при воздействии света и темноты соответственно приводят к разнонаправленным изменениям показателей развития в раннем постнатальном онтогенезе и темпов полового созревания животных. Выраженность развивающихся изменений в этих световых условиях зависит от того, в какой период онтогенеза начиналось воздействие. При этом более чувствительными к специфическим световым режимам оказались крысы, воздействие на которых начиналось еще в период их внутриутробного развития. Очевидно, основной причиной этого является нарушение суточного ритма синтеза мелатонина эпифизом у беременных и лактирующих самок.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 12-04-31368), программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса 2013», гранта Президента РФ НШ-1410.2014.4 и Программы стратегического развития ПетрГУ на 2013–2014 год.

Литература

- Анисимов В. Н., Виноградова И. А., Борисенков М. Ф., Букалев А. В., Забежинский М. А., Панченко А. В., Попович И. Г., Семенченко А. В., Тындык М. Л. Световой режим, старение и рак // Вестник Российского университета дружбы народов: Медицина. 2012. № S7. С. 29–30.
- Хижин Е. А., Юнаш В. Д., Узенбаева Л. Б., Виноградова И. А., Илюха В. А., Ильина Т. Н., Баранова Ю. П., Морозов А. В. Отсутствие фотопериодизма нарушает функционирование физиологических систем в постнатальном онтогенезе крыс // Труды КарНЦ РАН. 2013. № 3. С. 149–158.
- Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации // Ред. Ю. Б. Белоусова. М., 2005. 156 с.
- Anisimov V. N. Light pollution, reproductive function and cancer risk // Neuroendocrinol. Lett. 2006. Vol. 27, № 1–2. P. 35–52.
- Beery A. K., Paul M. J., Routman D. M., Zucker I. Maternal photoperiodic history affects offspring development in syrian hamsters // J. Biol. Rhythms. 2008. Vol. 23, N 5. P. 445–455.
- Bishnupuri K. S., Haldar C. Impact of photoperiodic exposures during late gestation and lactation periods on the pineal and reproductive physiology of the Indian palm squirrel, *Funambulus pennanti* // Journal of Reproduction and Fertility. 2000. Vol. 118. P. 295–301.
- Bronson F. H. Mammalian reproduction: an ecological perspective // Biol. Reprod. 1985. Vol. 32. P. 1–26.
- Butler M. P., Trumbull J. J., Turner K. W., Zucker I. Timing of puberty and synchronization of seasonal rhythms by simulated natural photoperiods in female Siberian hamsters // Am. J. Physiol. 2007a. Vol. 293. P. R413–R420.
- Butler M. P., Turner K. W., Park J. H., Butler J. P., Trumbull J. J., Dunn S. P., Villa P., Zucker I. Simulated natural day lengths synchronize seasonal rhythms of asynchronously born male Siberian hamsters // Am. J. Physiol. 2007b. Vol. 293. P. R402–R412.
- Craven R. P., Clarke J. R. Gonadotrophin levels in male voles (*Microtus agrestis*) reared in long and short photoperiods // J. Reprod. Fertil. 1982. Vol. 66. P. 709–714.
- Csaba G., Barath P. Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body // Endocrinol. Exp. 1975. Vol. 9. P. 59–67.
- Dark J., Dark K. A., Zucker I. Long day lengths increase brain weight and DNA content in the meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*) // Brain Res. 1987. Vol. 409. P. 302–307.
- Dark J., Spears N., Whaling C. S., Wade G. N., Meyer J. S., Zucker I. Long day lengths promote brain growth in meadow voles // Dev Brain Res. 1990. Vol. 53. P. 264–269.
- Davis F. C. Melatonin: role in development // Journal of Biological Rhythms. 1997. Vol. 12. P. 498–508.
- Edmonds K. E., Stetson M. H. Effects of prenatal and postnatal photoperiods and of the pineal gland on early testicular development in the marsh rice rat (*Oryzomys palustris*) // Biol. Reprod. 1995. Vol. 52. P. 989–996.
- Frost D., Zucker I. Photoperiod and melatonin influence seasonal gonadal cycles in the grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*) // J. Reprod. Fertil. 1983. Vol. 69. P. 237–244.
- Hoffmann K. Effects of short photoperiods on puberty, growth and moult in the djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) // J. Reprod. Fertil. 1978. Vol. 54. P. 29–35.
- Hong S. M., Stetson M. H. Functional maturation of the gonads of Turkish hamsters under various photoperiods // Biol. Reprod. 1986. Vol. 35. P. 858–862.
- Horton T. H. Growth and reproductive development of male *Microtus montanus* is affected by the prenatal photoperiod // Biol. Reprod. 1984. Vol. 31. P. 499–504.
- Horton T. H., Stachecki S. A., Stetson M. H. Maternal transfer of photoperiodic information in Siberian hamsters: peripubertal reproductive development in the absence of maternal photoperiodic signals during gestation // Biol. Reprod. 1990. Vol. 42. P. 441–449.
- Innes D. G. L., Millar J. S. Body weights, litter size and energetic of reproduction in *Clethrionomys gapperi* and *Microtus pennsylvanicus* // Canadian Journal of Zoology. 1981. Vol. 59. P. 785–789.
- Johnston P. G., Zucker I. Photoperiodic regulation of reproductive development in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) // Biol. Reprod. 1980. Vol. 22. P. 983–989.
- Kabithé E. W., Place N. J. Photoperiod-dependent modulation of anti-Müllerian hormone in female Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*) // Reproduction. 2008. Vol. 135. P. 335–342.
- Moore C. B., Siopes T. D. Enhancement of cellular and humoral immunity following embryonic exposure to melatonin in turkeys (*Meleagris gallopavo*) // Gen. Comp. Endocrinol. 2005. Vol. 143. P. 178–183.
- Stetson M. H., Elliott J. A., Goldman B. D. Maternal transfer of photoperiodic information influences the photoperiodic response of prepubertal Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*) // Biology of Reproduction. 1986. Vol. 34. P. 664–669.

Vermeulen M., Palermo M., Giordano M. Neonatal pinealectomy impairs murine antibody-dependent cellular cytotoxicity // J. Neuroimmunol. 1993. Vol. 43. P. 97–101.

Walton J. C., Weil Z. M., Nelson R. J. Influence of photoperiod on hormones, behavior, and immune function // Front Neuroendocrinol. 2011. Vol. 32, N. 3. P. 303–319.

Weil Z. M., Martin L. B., Nelson R. J. Photoperiod differentially affects immune function and reproduction in collared lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*) // J. Biol. Rhythms. 2006. Vol. 21. P. 384–393.

Whitsett J. M., Lawton A. D., Miller L. L. Photosensitive stages in pubertal development of male deer mice (*Peromyscus maniculatus*) // J. Reprod. Fertil. 1984. Vol. 72. P. 269–276.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Хижкин Евгений Александрович

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: hizhkin84@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Юнаш Виктория Дмитриевна

старший преподаватель кафедры фармакологии,
организации и экономики фармации с курсами
микробиологии и гигиены медицинского факультета,
к. м. н.
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: yunashvd@yandex.ru
тел.: (8142) 769871

Илюха Виктор Александрович

заведующий лабораторией экологической физиологии
животных, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ilyukha@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Виноградова Ирина Анатольевна

заведующая кафедрой фармакологии, организации
и экономики фармации с курсами микробиологии
и гигиены медицинского факультета, д. м. н.
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: iri89569627@yandex.ru
тел.: (8142) 769871

Морозов Артем Владимирович

ведущий биолог
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: artem.morozow@yandex.ru
тел.: (8142) 573107

Тимейко Надежда Геннадьевна

студентка медицинского факультета
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: limorgun@mail.ru
тел.: (8142) 769871

Khizhkin, Evgeny

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: hizhkin84@mail.ru
tel.: (8142) 573107

Yunash, Victoria

Petrozavodsk State University
33 Lenina St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: yunashvd@yandex.ru
tel.: (8142) 769871

Ilyukha, Victor

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ilyukha@bio.krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

Vinogradova, Irina

Petrozavodsk State University
33 Lenina St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: iri89569627@yandex.ru
tel.: (8142) 769871

Morozov, Artem

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: artem.morozow@yandex.ru
tel.: (8142) 573107

Timeyko, Nadezhda

Petrozavodsk State University
33 Lenina St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: limorgun@mail.ru
tel.: (8142) 769871

УДК 582.632:581.132:581.52

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕТОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ ФОТОСИНТЕЗА У КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ И БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ В УСЛОВИЯХ РАЗНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ЭЛЕМЕНТАМИ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

В. К. Болондинский, Л. М. Виликайнен

Институт леса Карельского научного центра РАН

Проведена сравнительная оценка CO_2 -газообмена у листьев березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской березы (*Betula pendula* var. *carelica*) при разных уровнях минерального питания. После подкормки саженцев, растущих в вегетационных сосудах, наблюдали при высокой освещенности увеличение средних величин CO_2 -газообмена в 1,4 раза. Темновое дыхание у березы повислой выросло в 2,3 раза и стало почти в 2 раза выше, чем у карельской березы. За исключением этого показателя достоверных различий между двумя формами берез получить не удалось. У удобренных саженцев, адаптированных к низким значениям ФАР, наблюдали достоверные различия параметров световых кривых: светового компенсационного пункта и константы насыщения. Более низкие значения этих показателей у карельской березы свидетельствуют об эффективном использовании ею низкой ФАР, позволяющем выживать в условиях сильного затенения.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Betula* L., карельская береза, CO_2 -газообмен, дыхание, световые кривые фотосинтеза.

V. K. Bolondinskii, L. M. Vilikainen. RESEARCH OF PHOTOSYNTHESIS LIGHT DEPENDENCE IN KARELIAN BIRCH AND COMMON (SILVER) BIRCH IN DIFFERENT MINERAL NUTRIENT AVAILABILITY SETTINGS

A comparative estimation of CO_2 gas exchange in leaves of common (silver) birch (*Betula pendula* var. *pendula*) and Karelian birch (*Betula pendula* var. *carelica*) was carried out at different levels of mineral nutrition. After an additional fertilizing, saplings growing in pots under high insolation showed the 1.4-fold increase in average rates of CO_2 gas exchange. Dark respiration in common birch increased 2.3-fold and became almost twice that of Karelian birch. Except for this parameter, no significant differences between the two forms of birch were revealed. Fertilized saplings adapted to low levels of solar radiation showed significant differences in the parameters of light response curves: the light compensation point and the saturation constant. Lower values of these parameters in Karelian birch indicate its effective utilization of low values of solar radiation, allowing it to survive under the conditions of strong shadow.

K e y w o r d s: *Betula* L., Karelian birch, CO_2 gas exchange, respiration, light response curve for net photosynthesis.

Введение

Связь между усвоением углерода и азота сложна и многообразна. Хорошо известно, что азотный метаболизм оказывает влияние на процессы газообмена. При этом поступление неорганического азота в растение, как и поглощение углекислоты, зависит от светового фактора [Андреева, 1982]. Азот, фосфор и другие элементы необходимы для формирования фотосинтетического аппарата. В то же время избыток азота у растений не только приводит к усилению накопления азота в листьях, но вызывает также подавление активности ферментов хлоропластов, связанных как с транспортом электронов, так и с фиксацией CO_2 [Чиков и др., 2012].

Наличие в хлоропластах собственных белок-синтезирующих систем обеспечивает эндогенную регуляцию фотосинтеза с помощью дополнительного синтеза регуляторных ферментов и дает возможность растению быстро реагировать на изменение внешних условий, прежде всего света [Бухов, 2004]. Эффективная работа фотосинтеза в значительной степени определяется способностью к быстрым адаптационным перестройкам в соответствии с условиями окружающей среды.

Проведение измерений CO_2 -газообмена на участках с разными дозами внесенных минеральных удобрений часто не показывает достоверных различий в средних величинах фотосинтеза. Причины этого коренятся в неравномерном распределении доз, перехватывании части подкормки травянистым покровом, вымывании удобрений дождями и т. д. Эти факторы не проявляют себя, если эксперименты проводятся на растениях, пересаженных в вегетационные сосуды. В отличие от березы повислой (*БП*) CO_2 -газообмен карельской березы (*БК*) в естественных условиях почти не исследовался. Данные о световом режиме фотосинтеза *БК* приводятся в монографии Ю. Л. Цельникер [1978], где саженцы *БК* были взяты в качестве замены саженцев *БП*, так как семена последней часто имеют гибридное происхождение (*B. pendula* $\times$ *B. pubescens*) и в первом поколении растения обнаруживают расщепление признаков. В результате приводилось сравнение *БК* с другими древесными породами, за исключением березы повислой.

Изучение CO_2 -газообмена саженцев (целиком, вместе с почвой), проведенное С. Н. Дроздовым с соавт. [1995] в климатической камере, выявило большую требовательность карельской березы к освещенности, чем березы повислой. Как показали наши предыдущие исследования [Болондинский, 2010, Болондинский, Холопце-

ва, 2013], при изучении этих двух экологических форм березы современными эколого-физиологическими методами в природных условиях можно получать важную информацию об адаптационных механизмах, позволяющих *БК* в достаточно узкой экологической нише быть конкурентоспособной с *БП* и другими видами древесных растений.

В нашу задачу входило исследование световой зависимости фотосинтеза у саженцев карельской березы и березы повислой в условиях разной обеспеченности элементами минерального питания.

Материалы и методы

Работу проводили в июле–августе 2012 г. на территории Агробиологической станции КарНЦ РАН, расположенной в 2 км от г. Петрозаводска. При оптимальных внешних условиях и хорошей оводненности почвы исследовали CO_2 -газообмен листьев у 3-летних саженцев, растущих в 10-литровых вегетационных сосудах. Пять из них были выращены из семян березы повислой и шесть – из семян карельской березы. В июне – первой половине июля листья у саженцев были в основном мелкие (не более 7 см^2), что характерно для листьев первой генерации [Николаева, Новицкая, 2006]. После резкого повышения температуры 30–31 июля начался интенсивный рост побегов и листьев, при этом площадь листьев в ряде случаев достигла $25\text{--}30 \text{ см}^2$. До августа подкормки не вносились. 24–26 июля были проведены первые измерения CO_2 -газообмена. Затем 2 августа по три саженца каждой формы березы были удобрены аммофоской (NPK 12:15:15) – 10 г на сосуд. Через 10 дней после этого и до конца августа мы проводили на них измерения.

Измерения CO_2 -газообмена с 3-кратной повторностью проводили на интактных сформировавшихся листьях с помощью портативной фотосинтетической системы Li-6200 (LiCor, USA). Всего было проведено около 800 измерений фотосинтеза. Фотосинтетически активная радиация (ΦAP) и другие параметры измерялись датчиками Li-Cor, температура и относительная влажность воздуха – стандартными метеорологическими приборами. Рассчитывались показатель использования ΦAP при фотосинтезе (P) – количество $\mu\text{моль CO}_2 / \text{ммоль фотонов}$ (K_p) и коэффициент эффективности или экономический коэффициент фотосинтеза (E_p), равный отношению брутто-фотосинтеза к темновому дыханию (R). $E_p \approx (P + R)/R$ и характеризует максимально возможную эффективность газообмена [Лархер, 1978].

Для снятия световых кривых камеру с листом ориентировали прямо на солнце и за 1 минуту перед измерением покрывали слоями марли или тканью разной плотности. После каждого уменьшения освещенности измеряли все показатели, регистрируемые прибором (ΦAP , CO_2 -газообмен, концентрация CO_2 в камере, температура и влажность воздуха в камере и т. д.). Эксперименты в основном проводили в дневной динамике с 10 до 16 часов. Старались выбирать ясные безоблачные дни.

Световую кривую фотосинтеза моделировали с помощью нелинейного регрессионного анализа гиперболой (функция Микаэлиса-Ментен):

$$P(I(x,t)) = a_1 + b_1 \cdot I(x,t) / (I(x,t) + b_2),$$

где a_1 – параметр, характеризующий CO_2 -газообмен при $I(\Phi AP) = 0$, т. е. уровень дыхания (R); b_1 – величина фотосинтеза при насыщающих значениях ΦAP (P_{max}); b_2 (константа насыщения) – параметр, равный величине I , при которой $P = 0,5P_{max}$, и является характеристикой скорости насыщения световой кривой; t – время; x – переменная, характеризующая положение листа в пространстве. Формально b_1 – теоретически возможный максимум фотосинтеза при освещенности, стремящийся к бесконечности. Обычно он близок к величине скорости фотосинтеза при максимально возможной в природе величине освещенности. Максимальный фотосинтез у *Betula pendula* наблюдается чаще всего после завершения формирования листа по площади и биомассе [Oleksyn et al., 2000].

Из уравнения Микаэлиса-Ментен рассчитывали ряд дополнительных параметров:

а) световой компенсационный пункт ($СКП$) – интенсивность света, при которой суммарный CO_2 -газообмен ($P(I(x,t))$) равен нулю. $СКП$, имеющий размерность освещенности, рассчитывался по формуле $I_{P=0} = -a_1 \cdot b_2 / (a_1 + b_1)$;

б) тангенс угла наклона световой кривой при низких интенсивностях освещения ($tg \alpha$). Его размерность – мкмоль CO_2 /мкмоль фотонов. Рассчитывался как производная $P(I(x,t))$ в точке $I_{P=0}$ ($СКП$) по формуле $tg \alpha = b_1 \cdot b_2 / (I_{P=0} + b_2)^2$.

Все параметры модели имеют определенный физиологический смысл, и их можно интерпретировать как потенциальную эколого-физиологическую характеристику изучаемого вида. Между ними существуют определенные взаимосвязи, изменяющиеся в процессе вегетации [Кайбейянен, 2009].

Проверку гипотез и оценку существенных различий между средними величинами осуществляли с помощью критерия Стьюдента при 5-процентном уровне значимости.

Результаты и обсуждение

Измерения проводили преимущественно в солнечные дни при умеренной температуре воздуха (18–20 °C). Растения регулярно поливались и не испытывали недостатка почвенной влаги. Содержание в почве NPK до внесения удобрений составляло: $N = 0,19 \pm 0,09$ %; $P = 0,11 \pm 0,05$ %; $K = 0,05 \pm 0,02$ %. Фотосинтез (P) измеряли в солнечные дни на плато световой кривой, и небольшие различия в ΦAP не приводили к существенным искажениям результатов. Были рассчитаны для разных вариантов эксперимента средние значения фотосинтеза и параметров внешней среды. Для этого отбирались максимальные значения P и R , полученные во время снятия световой кривой. К ним присоединяли отдельные измерения фотосинтеза и дыхания, сделанные в солнечную погоду. Величины CO_2 -газообмена были близки к полученным нами ранее у свободно растущих саженцев при хорошей оводненности почвы, умеренных температуре и дефиците водяных паров воздуха [Болондинский, 2010; Болондинский, Холопцева, 2013].

После внесения удобрений наблюдали изменения показаний CO_2 -газообмена у всех экспериментальных деревьев. У $БК$ нетто-фотосинтез вырос в среднем в 1,34, брутто-фотосинтез – в 1,32 раза, у $БП$ – соответственно в 1,47 и 1,52 раза. Достоверность различий в CO_2 -газообмене $БП$ и $БК$ установить не удалось. Если до внесения подкормки средние величины нетто-фотосинтеза у $БК$ и $БП$ различались в 1,19 раза, то после – в 1,09 раза, то есть разница в значениях CO_2 -газообмена нивелировалась. В некоторой степени это связано с тем, что после подкормки ростовые процессы побегов и листьев у $БП$ носили более интенсивный характер, чем у $БК$. Средняя температура июля была ниже нормы, и листья росли медленнее, чем в предыдущие годы. Значительная стимуляция роста произошла 30–31 июля, когда температура воздуха достигла 30 °C. Интенсивный рост продолжался и далее при температуре 19–20 °C. Это отразилось на величинах темнового дыхания листьев (табл. 1).

Как показали наши предыдущие исследования [Болондинский, 2010], темновое дыхание у листьев карельской березы в среднем на 15–20 % выше, чем у березы повислой, в широком диапазоне факторов внешней среды. До внесения удобрений темновое дыхание $БК$ и $БП$ составляло соответственно $1,6 \pm 0,4$ и $1,1 \pm 0,3$ мкмоль $m^{-2} s^{-1}$, после – $1,7 \pm 0,06$ и $2,5 \pm 0,9$ мкмоль $m^{-2} s^{-1}$. Если дыхание у $БК$ практи-

Таблица 1. Средние значения величин CO_2 -газообмена у саженцев карельской березы и березы повислой в условиях разной обеспеченности элементами минерального питания

	<i>H</i>	<i>T</i>	<i>D</i>	<i>ΦAP</i>	<i>NP</i>	<i>R</i>	<i>BP</i>	<i>K_p</i>
	%	°C	Па	мкмоль м ⁻² с ⁻¹				*
	Карельская береза, контроль							
М	65	15,2	617	1583	16	−1,6	17,6	12,1
σ	1	0,4	22	306	3,9	0,4	4,2	5
	Карельская береза, подкормка							
М	57	16,5	827	1722	21,5	−1,7	23,2	13,6
σ	9	1,8	236	204	2,6	0,6	2,6	1,5
	Береза повислая, контроль							
М	58	15,5	749	1437	13,5	−1,1	14,6	14,3
σ	7	2,2	207	721	4,5	0,3	4,7	10,7
	Береза повислая, подкормка							
М	60	15,7	716	1817	19,8	−2,5	22,3	12,3
σ	8	0,8	191	125	1,4	0,9	0,8	0,8

Примечание. H , T , D – относительная влажность, температура и дефицит водяного пара воздуха соответственно; NP , BP и R – нетто-фотосинтез, брутто-фотосинтез и темновое дыхание листа; K_p – показатель использования ΦAP при фотосинтезе (* – мкмоль CO_2 / ммоль фотонов); M – среднее значение, σ – стандартное отклонение.

чески не изменилось, то у $БП$ оно достоверно повысилось в 2,3 раза. Рост листьев после внесения удобрений у березы повислой имел более интенсивный характер, чем у березы карельской. Коэффициент использования ΦAP при фотосинтезе (K_p) при значениях освещенности, соответствующих плато световой кривой, изменялся в малых пределах. Небольшие различия, имевшие место как после внесения удобрения, так и между двумя формами, были недостоверны. В разные периоды ростовой активности влияние подкормки на CO_2 -газообмен проявлялось неодинаково. Так, при похолодании в конце августа и затухании ростовых процессов CO_2 -газообмен у удобренных саженцев был больше, чем у контрольных, всего на 12–15 %. Наиболее ярко различия проявлялись в относительно теплый период, когда наблюдался интенсивный рост побегов.

Существенное влияние оказывала подкормка и на изменение параметров световых кривых фотосинтеза. Анализ параметров моделей световых кривых подтвердил выводы, сделанные на основании отдельных измерений. Параметр a_1 , характеризующий усредненный уровень дыхания листьев, первоначально был в 1,9 раза выше у $БК$, чем у $БП$. Подкормка саженцев несколько сгладила различия. Однако высокий уровень дыхания после внесения удобрений привел у березы повислой к росту величины светового компенсационного пункта ($СКП$) – до 25,9 мкмоль $\text{m}^{-2} \text{c}^{-1}$. У $БК$, наоборот, $СКП$ снизился и составил 17,4 мкмоль $\text{m}^{-2} \text{c}^{-1}$. Это говорит о том, что при низкой освещенности лист $БК$ поглощал углекислоту, в то время как у $БП$ наблюдалось бы ее выделение. У карельской березы проявилась и тенденция к большему снижению константы насыщения (b_2), характеризующей крутизну световой кри-

вой. Тангенс угла наклона световой кривой при малых значениях освещенности также вырос, причем в большей степени у $БК$, чем у $БП$. Уровень плато световой кривой (b_1) увеличился после внесения удобрений у обеих форм березы (табл. 2). Достоверные различия у параметров световых кривых $БК$ и $БП$ были только у параметра a_1 до внесения удобрений.

Анализ изменений параметров световых кривых показал их тесную взаимосвязь. С учетом того, что $a_1 \ll b_1$, $СКП \cong b_2 \times (a_1 / b_1)$. У березы повислой после подкормки удобрениями эффект от увеличения a_1 в 2,2 раза значительно более сильный, чем от умеренного роста b_1 (в 1,3 раза) и уменьшения в 1,2 раза b_2 , привел к росту $СКП$. У карельской же березы незначительное уменьшение a_1 при примерно таком же, как у $БП$, изменении параметров b_1 и b_2 $СКП$, напротив, снизился. Менее активный рост листьев и побегов у $БК$ по сравнению с $БП$ при усилении азотного питания, отразившийся в умеренном темновом дыхании, дал ей определенные преимущества в поглощении CO_2 в условиях низкой освещенности.

Фотосинтетический аппарат растений настраивается на имеющийся в данный момент уровень освещенности [Oleksyn et al., 2000]. Наши эксперименты не выявили существенных различий у параметров световых кривых фотосинтеза между двумя формами, как это наблюдалось и в предыдущих экспериментах на саженцах 3–8 лет. Тогда некоторые различия проявились в стрессовых условиях, например, при атмосферной и почвенной засухе [Болондинский, Виликайнен, 2011а, б]. Условия же нашего эксперимента были очень комфортными для растений, которые не испытывали ни недостатка почвенной влаги,

Таблица 2. Средние значения параметров моделей световых кривых фотосинтеза у саженцев карельской березы и березы повислой в условиях разной обеспеченности элементами минерального питания

	a_1	b_1	b_2	r^2	I_{max}	R_{max}	P_{max}	СКП	$tg \alpha$
	мкмоль м ⁻² с ⁻¹			%	мкмоль м ⁻² с ⁻¹				*
	Карельская береза, контроль								
М	-2,03	22,6	323,6	95,8	1810	-1,72	17,9	30,9	0,06
σ	0,64	5,0	16,7	2,3	94	0,38	3,7	1,9	0,01
	Карельская береза, подкормка								
М	-1,85	26,4	260,7	97,3	1685	-1,80	22,0	17,4	0,10
σ	0,68	2,6	106,3	1,7	172	0,60	2,2	4,4	0,03
	Береза повислая, контроль								
М	-1,16	19,5	288,6	94,2	1884	-1,35	16,5	17,7	0,06
σ	0,19	7,8	137,8	4,8	435	0,38	4,0	3,1	0,01
	Береза повислая, подкормка								
М	-2,61	26,1	241,4	96,6	1917	-2,67	22,6	25,9	0,09
σ	0,91	1,3	55,8	1,0	38	0,77	1,9	8,2	0,01

Примечание. Здесь и в табл. 3: М, – средние значения и стандартные отклонения соответственно, a_1 , b_1 , b_2 – значения параметров моделей световых кривых (см. методику), r^2 – коэффициент детерминации, I_{max} , R_{max} , P_{max} – соответственно максимальные значения ФАР, фотосинтеза и абсолютной величины дыхания в момент снятия световой кривой, СКП – световой компенсационный пункт, $tg \alpha$ – тангенс угла наклона световой кривой к оси абсцисс в точке СКП (* – мкмоль СО₂ м⁻² с⁻¹ / мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹).

ни стресса из-за высокой температуры. Внешние условия были близки к оптимальным [Болондинский, 2009].

Как показали наблюдения за посадками разных лет на Агробиологической станции КарНЦ РАН, 40-летние деревья карельской березы лучше адаптированы к низким значениям освещенности, чем деревья березы повислой, и могут расти там, где последняя гибнет. Механизм, способствующий выживанию карельской березы в таких условиях, вероятно, связан с более эффективным использованием фотосинтетическим аппаратом малых доз солнечной радиации. Для проверки этого предположения во второй половине августа сосуды с саженцами были помещены под навес, где в малооблачный день ФАР изменялась в пределах 100–130 мкмоль м⁻² с⁻¹. После пяти дней нахождения в таких условиях замеры фотосинтеза показали, что у исследуемых растений при значениях ФАР 120–130 мкмоль м⁻² с⁻¹, средние величины фотосинтеза составляли у карельской березы и у березы повислой соответственно 5,9 ± 1,2 и 6,6 ± 1,9 мкмоль м⁻² с⁻¹ (табл. 3).

Таблица 3. Средние значения параметров моделей световых кривых фотосинтеза у удобренных саженцев карельской березы и березы повислой, акклиматизированных к низким значениям ФАР

	a_1	b_1	b_2	r^2	I_{max}	R_{max}	P_{max}	СКП	$tg \alpha$
	мкмоль м ⁻² с ⁻¹			%	мкмоль м ⁻² с ⁻¹				
	Карельская береза, подкормка								
М	-0,82	9,7	74,7	91,3	125	-0,88	5,9	10,4	0,081
σ	0,18	2,6	26,3	2,7	42	0,16	1,2	1,4	0,019
	Береза повислая, подкормка								
М	-1,02	10,1	128,4	93,6	129	-1,07	6,6	18,9	0,073
σ	0,17	1,3	35,8	1,9	37	0,17	1,9	2,2	0,017

При этом коэффициенты K_p (показатель использования ФАР при фотосинтезе) увеличились по сравнению с показателями, когда растения находились на солнце, более чем в 3,5 раза. У растений, находившихся в тени, листья характеризовались и более низкими величинами темнового дыхания – 0,88 ± 0,16 и 1,07 ± 0,17 мкмоль м⁻² с⁻¹ у БК и БП соответственно. Это привело и к снижению СКП у исследуемых растений – 10,4 ± 1,4 и 18,9 ± 2,2 мкмоль м⁻² с⁻¹ у БК и БП соответственно. При этом различия были значимыми ($p < 0,05$). Растения, выращенные из семян БК, могли поглощать углекислоту при очень низких значениях освещенности. Подобное явление мы наблюдали и у взрослых деревьев БК, растущих под пологом леса в условиях еще более жестких, чем в нашем эксперименте. СКП у них был еще ниже – 6–8 мкмоль м⁻² с⁻¹, что обеспечивало положительный баланс листьев нижних ветвей. Подобные адаптации к свету характерны для теневыносливых растений [Larcher, 1995]. Снижение светового компенсационного пункта до очень низких значений является важным адаптационным признаком карельской березы, позволяющим ей существовать под пологом леса при относительно высоком плодородии почвы достаточно длительное время.

Модели световых кривых фотосинтеза БК, построенные по начальному участку световой кривой (см. табл. 3), подтверждают высокую способность карельской березы использовать малые дозы солнечной радиации. Адаптационным признаком являлось низкое значение коэффициента a_1 , характеризующего темновое дыхание. Значения асимптот гипербол (b_1), характеризующих максимально возможный фотосинтез при очень больших значениях ФАР,

составили $9,7 \pm 2,6$ и $10,1 \pm 2,3$ мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ для БК и БП соответственно, что примерно в 2,5 раза меньше, чем у саженцев, растущих на открытом месте. Быстрые измерения фотосинтеза на саженцах, вынесенных из тени на солнце, давали величины, мало отличающиеся от этих значений. Однако уже через 2–3 минуты фотосинтез значительно возрастал. Данный факт говорит о том, что кратковременные солнечные блики, довольно часто попадающие на листья деревьев, растущих близко к кромке леса, хотя и увеличивают фотосинтез, но до значительно меньших величин, чем у листьев на солнце. Достоверной в теневых условиях оказалась и разница в константах насыщения (b_2). Сравнение величин тангенсов угла наклона световых кривых к оси абсцисс (см. табл. 3) показало, что световые кривые у БК более крутые, чем у БП, и это подтверждает наши выводы о более эффективном использовании березой карельской низких значений инсоляции.

Выводы

Средние величины CO_2 -газообмена березы повислой и карельской березы при высоком уровне освещенности близки друг к другу. Внешение 10 г аммофоски на сосуд повышало уровень CO_2 -газообмена у двух форм березы в среднем в 1,4 раза. Темновое дыхание у БК повышалось с 1,6 до 1,7, у БП – с 1,1 до 2,5 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. В отличие от всех других величин разница в дыхании была достоверной.

Величины параметров световых кривых фотосинтеза зависели от того, в каких световых условиях находились растения перед проведением измерений.

У удобренных саженцев, произрастающих в условиях низкой освещенности, более чем в два раза снижалось темновое дыхание, уровень плато и константа насыщения световой кривой. Величины параметров световых кривых у БК уменьшались в большей степени, чем у БП. Получены достоверные различия средних величин светового компенсационного пункта и константы насыщения.

Сдвиг светового компенсационного пункта в область ФАР 10–12 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, более высокая крутизна световой кривой дают возможность фотосинтетическому аппарату карельской березы эффективно использовать низкую освещенность и позволяют, произрастая на плодородной почве, в условиях сильного затенения сохранять положительный углеродный баланс.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-00827-а).

Литература

- Андреева Т. Ф. Азотный обмен растения // Физиология фотосинтеза. М.: Наука, 1982. С. 89–104.
- Болондинский В. К. Исследование зависимости фотосинтеза от интенсивности солнечной радиации, температуры и влажности воздуха у растений карельской березы и березы повислой // Труды КарНЦ РАН. 2010. № 2. С. 3–10.
- Болондинский В. К., Виликайнен Л. М. Исследование световой зависимости фотосинтеза у саженцев березы в норме и в условиях почвенной засухи // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды. Петрозаводск, 2011а. С. 38–42.
- Болондинский В. К., Виликайнен Л. М. Исследование CO_2 -газообмена листьев березы повислой и карельской березы в условиях засухи 2010 г. // Труды КарНЦ РАН. 2011б. № 3. С. 12–15.
- Болондинский В. К., Холопцева Е. С. Исследование фотосинтеза и транспирации у карельской березы и березы повислой // Труды КарНЦ РАН. 2013. № 3. С. 173–178.
- Бухов Н. Г. Динамическая световая регуляция фотосинтеза // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 825–837.
- Дроздов С. Н., Попов Э. Г., Курец В. К., Таланов А. В., Обшатко Л. А., Ветчинникова Л. В. Влияние света и температуры на нетто-фотосинтез и дыхание *Betula pendula* var. *pendula* и *Betula pendula* var. *carelica* (Betulaceae) // Ботанический журнал. 1995. Т. 80, № 3. С. 60–64.
- Кайбейянен Э. Л. Параметры световой кривой фотосинтеза у *Salix dasyclados* и их изменение в ходе вегетации // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 4. С. 490–499.
- Лархер В. Экология растений. М.: Мир, 1978. 384 с.
- Николаева Н. Н., Новицкая Л. Л. Особенности весенних фаз развития карельской березы // Лесоведение. № 6. 2006. С. 59–65.
- Чиков В. И., Салыхова Г. А., Сафиуллина Г. Ф., Замалиева Ф. Ф. Фотосинтез, транспорт ассимилятов и продуктивность у растений картофеля, выращиваемых при разной освещенности // Сельскохозяйственная биология. 2012. № 1. С. 72–77.
- Цельникер Ю. Л. Физиологические основы теневыносливости древесных растений. Л.: Наука, 1978. 215 с.
- Larcher W. Physiological plant ecology, 3rd Edn. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 506 p.
- Oleksyn J., Zytowski R., Reich P. B., Tjoelker M. G., Karolewski P. Ontogenetic patterns of leaf CO_2 exchange, morphology and chemistry in *Betula pendula* trees // Trees. 2000. Vol. 14. P. 271–281.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Болондинский Виктор Константинович

научный сотрудник, к. б. н.
Институт леса Карельского научного центра РАН
Пушкинская 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: bolond@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

Виликайнен Людмила Матвеевна

физик
Институт леса Карельского научного центра РАН
Пушкинская 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: vilikainen@mail.ru
тел.: (8142) 768160

Bolondinskii, Victor

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: bolond@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 768160

Vilikainen, Lyudmila

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: vilikainen@mail.ru
tel.: (8142) 768160

УДК 581. 1

ДИНАМИКА ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНТЕНСИВНОСТИ ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

И. А. Нилова, А. Ф. Титов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучена динамика теплоустойчивости проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39 в зависимости от интенсивности температурного воздействия (в диапазоне от 33 до 45 °C с интервалом в 2°). Показано, что воздействие на проростки температур 33, 35, 37 и 39 °C оказывает качественно однотипное влияние – увеличение теплоустойчивости, которая по достижении максимума в дальнейшем уже не изменяется, а все наблюдаемые между этими температурными воздействиями различия в динамике теплоустойчивости носят только количественный характер. При увеличении температуры до 43–45 °C характер динамики теплоустойчивости проростков качественно изменялся: в этом случае как при 43 °C, так при 45 °C первоначально происходил быстрый рост теплоустойчивости, который затем сменялся резким ее снижением. Температура 41 °C оказалась «пограничной» между температурами 33–39 и 43–45 °C. Из полученных данных следует, что характер реакции растений на действие высокой температуры может изменяться не только количественно, но и качественно в зависимости от интенсивности температурного воздействия.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Triticum aestivum* L., высокие температуры, интенсивность высокотемпературного воздействия, устойчивость.

I. A. Nilova, A. F. Titov. THE DYNAMICS OF THERMOTOLERANCE IN WHEAT PLANTS DEPENDING ON THE INTENSITY OF HIGH TEMPERATURE INFLUENCE

The dynamics of thermotolerance in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) of cv. Moscovskaya 39 depending on the intensity of high temperature impact was studied. The temperature ranged from 33 to 45 °C with an interval of 2°. The temperatures 33, 35, 37 and 39 °C had essentially the same effect on the seedlings: thermotolerance rose to a maximum and then remained unchanged. Thermotolerance at these temperatures differed only in a quantitative sense. When the temperature was raised to 43–45 °C, the pattern of change in thermotolerance of seedlings was qualitatively different. In this case, at 43 °C, as well as at 45 °C, thermotolerance first grew rapidly but then dropped sharply. The temperature of 41 °C appeared to be an interstage between 33–39 °C and 43–45 °C. The data obtained suggest that the pattern of plant response to the high temperature impact can vary not only quantitatively but also qualitatively, depending on the intensity of the impact.

K e y w o r d s: *Triticum aestivum* L., high temperatures, the intensity of high temperature impact, tolerance.

Введение

В природных условиях растения на протяжении всей своей жизни находятся под непрерывным воздействием температуры, диапазон колебаний которой весьма широк [Лархер, 1978]. При этом считается, что высокие температуры переносятся растениями хуже, чем низкие [Чиркова, 2002]. Тем не менее растения очень быстро реагируют на тепловой стресс [Титов и др., 2006], а отклонения температуры окружающей среды от оптимальной для роста растений вызывают многочисленные физиологические, биохимические и молекулярные изменения в растительном организме [Wahid et al., 2007; Bitá, Gerats, 2013], значительная часть которых носит адаптивный характер и направлена в конечном счете на его выживание.

Как показывают исследования, благодаря наличию широкого спектра защитно-приспособительных реакций и адаптивных механизмов растения могут переносить воздействие относительно высоких температур, но только если их интенсивность и продолжительность не достигают критических значений. Более того, даже в случае действия на растения высокой повреждающей температуры они способны в начальный момент быстро мобилизовывать свои защитные силы, что, в частности, выражается в повышении их теплоустойчивости [Титов, 1989; Топчиева, 1994] и обеспечивает выживание, если температурное воздействие не оказывается достаточно продолжительным. В связи с этим детальное изучение динамики теплоустойчивости растений при температурах разной интенсивности является важным начальным звеном исследования теплоустойчивости, которое позволяет в дальнейшем изучать участие и роль конкретных механизмов повышения теплоустойчивости при тех или иных высокотемпературных воздействиях.

Учитывая это, мы провели сравнительное изучение особенностей динамики теплоустойчивости растений пшеницы, как интегрального показателя их устойчивости, при действии высоких температур разной интенсивности в рамках диапазона 33–45 °C.

Материалы и методы

Исследования проводили на проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, которые выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе в течение 7 суток с добавлением микроэлементов (рН 6,2–6,4) в камере искусственного климата при температуре воздуха 22 °C, его относительной влажности 60–70 %, освещен-

ности 10 клк и фотопериоде 14 ч. Затем недельные проростки подвергали воздействию температур от 33 до 45 °C с интервалом в 2 °C.

Продолжительность воздействия составляла от 30 мин до 5 суток. Теплоустойчивость растений оценивали по температуре (LT₅₀), вызывающей гибель 50 % палисадных клеток листа после 5-минутного прогрева листовых высе-чек в водном термостате [Александров, 1963].

Повторность в пределах каждого варианта 6-кратная. Каждый опыт повторяли не менее 2–3 раз. О достоверности различий между вариантами судили по критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Исследования выполнены с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что теплоустойчивость проростков пшеницы при температуре 33 °C, так же как и при температуре 35 °C, достоверно повышается через сутки, достигает максимума через двое суток и в дальнейшем остается неизменной. Динамика теплоустойчивости при данных температурных воздействиях носит схожий характер, за тем исключением, что при температуре 35 °C абсолютные значения теплоустойчивости были выше, чем при температуре 33 °C. Под влиянием температуры 37 °C теплоустойчивость повышалось через 1 час, а ее максимум достигался спустя двое суток. При 39 °C теплоустойчивость возрастала уже через 30 минут, а максимальное значение теплоустойчивости зафиксировано через 1 сутки. Дальнейшее увеличение экспозиции проростков при этих температурах не приводило к изменению их теплоустойчивости (рис. 1).

Следует отметить, что температуры 33, 35, 37 и 39 °C оказывали однотипное влияние на устойчивость растений, но количественные характеристики вызванных ими изменений в теплоустойчивости были различны. При 33, 35 и 37 °C повышение теплоустойчивости проростков происходило медленнее, а ее максимальный уровень был заметно ниже, чем при температуре 39 °C, которая, согласно полученным данным, вызывала максимальный закаливающий эффект.

Характер ответной реакции растений на действие температуры 41 °C был иным: повышение устойчивости через 30 минут, затем она продолжала увеличиваться в течение первых суток, а на 2-е сутки – снижалась

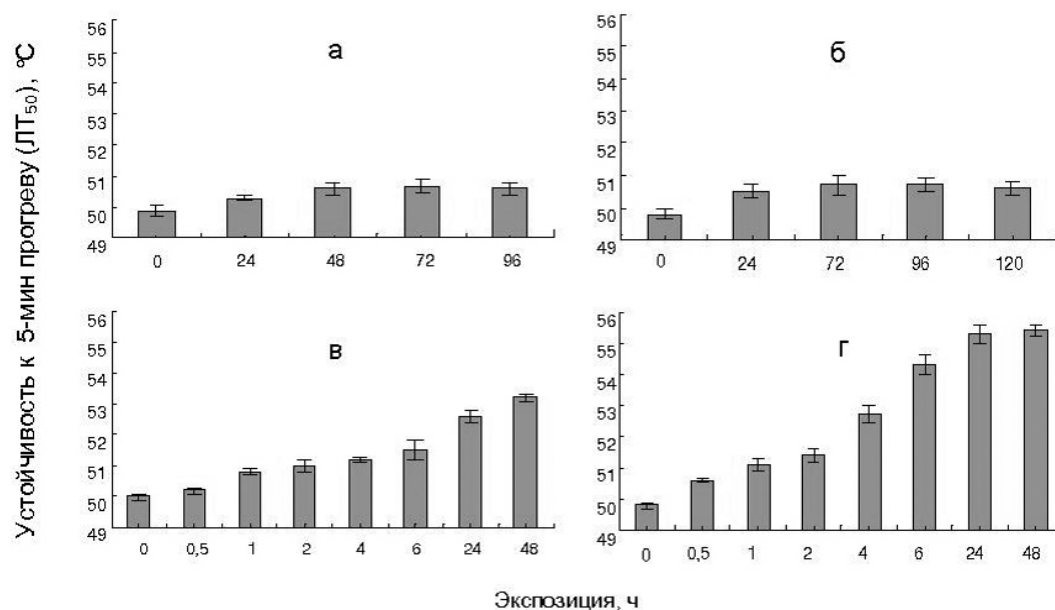


Рис. 1. Динамика теплоустойчивости проростков пшеницы при действии температур разной интенсивности: а – 33, б – 35, в – 37, г – 39 °C

(рис. 2). Более высокие температуры (43 и 45 °C) оказывали сходное действие на теплоустойчивость пшеницы, под их влиянием зафиксирован быстрый рост теплоустойчивости уже в первые минуты воздействия, а затем наблюдалось резкое ее снижение, после чего, спустя несколько часов, происходила гибель растений. Отметим, что реакция рас-

тений на действие температур 43 и 45 °C, как и при 33, 35, 37 и 39 °C, различалась по своим количественным характеристикам. В частности, при температуре 43 °C теплоустойчивость возрастала и снижалась более плавно, чем при 45 °C. Максимальный прирост теплоустойчивости при 43 °C также был выше, чем при 45 °C.

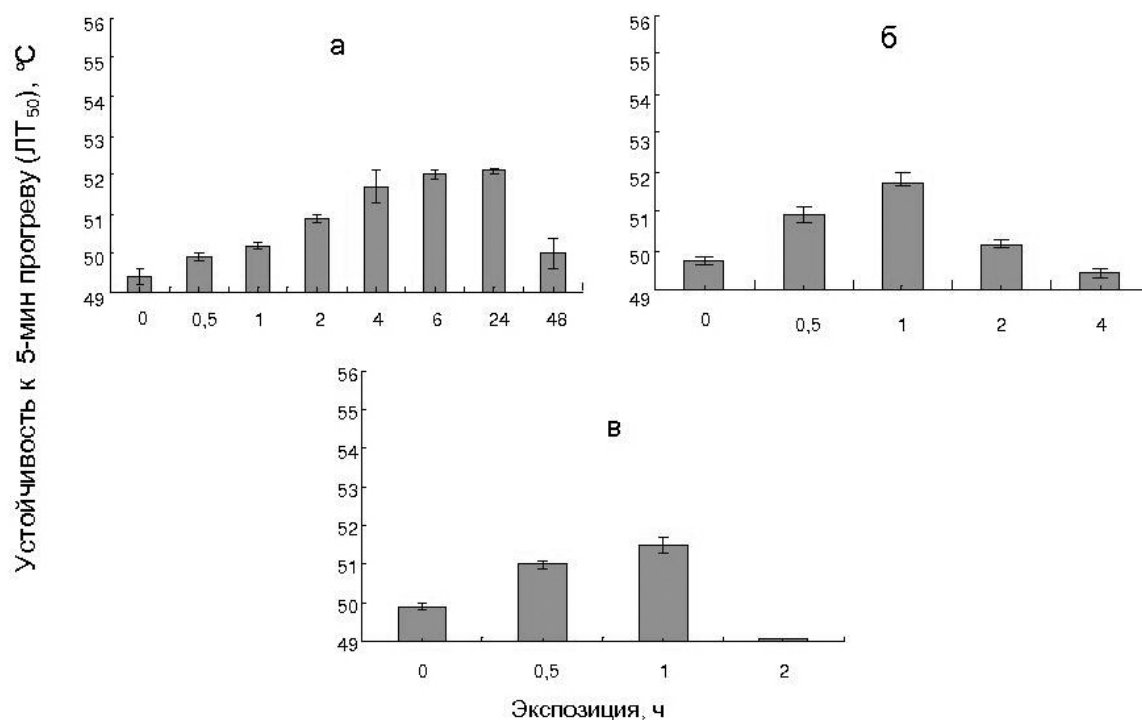


Рис. 2. Динамика теплоустойчивости проростков пшеницы при действии температур разной интенсивности: а – 41, б – 43, в – 45 °C

Анализ этих и ранее полученных данных [Титов и др., 1982; Топчиева, 1994] позволяет заключить, что в целом, в рамках изученного температурного диапазона, с увеличением интенсивности температурного воздействия максимум теплоустойчивости достигается быстрее. При этом максимальный прирост теплоустойчивости был отмечен нами при температуре 39 °С, а при воздействии более высоких температур (41, 43 и 45 °С) этот показатель был ниже. Также изменялся и характер реакции клеток пшеницы в зависимости от интенсивности температурного воздействия. При более мягких воздействиях (33–39 °С) теплоустойчивость при достижении максимального значения сохранялась в дальнейшем неизменной, в то время как при воздействии более высокой температуры (43 и 45 °С) теплоустойчивость вначале быстро возрастала, а затем резко снижалась, что приводило в дальнейшем к гибели растения. Температура 41 °С оказалась для проростков пшеницы данного сорта «пограничной», а ответная реакция растения на эту температуру носила переходный характер, так как под ее влиянием теплоустойчивость первоначально увеличивалась и сохранялась некоторое время на одном уровне, но позднее (через сутки) – снижалась.

На основе вышеизложенного можно сделать вывод, что разное по интенсивности воздействие высокой температуры вызывает неодинаковые как в количественном, так и в качественном отношении изменения в теплоустойчивости растений. Исходя из имеющихся в литературе данных, можно предположить, что подобные различия связаны с теми конкретными механизмами и их эффективностью, которые обеспечивают рост теплоустойчивости растений при тех или иных высокотемпературных воздействиях.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Нилова Ирина Александровна

аспирантка
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: im-ira@mail.ru
тел.: (8142) 762712

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, руководитель лаб.
экологической физиологии растений,
чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: titov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769710

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 51.2, № г. р. 01201358737).

Литература

Александров В. Я. Цитофизиологические и цитологические исследования устойчивости растительных клеток к действию высоких температур // Тр. Ботан. Ин-та АН СССР. 1963. Т. 4. С. 234–280.

Лархер В. Экология растений. М.: Мир, 1978. 384 с.

Титов А. Ф., Критенко С. П., Балагурова Н. И. Динамика холодо- и теплоустойчивости листьев озимой и яровой пшеницы в зависимости от температурных условий // Влияние факторов внешней среды и физиологически активных веществ на терморезистентность и продуктивность растений. Петрозаводск, 1982. С. 27–37.

Титов А. Ф. Устойчивость активно вегетирующих растений к низким и высоким температурам: Закономерности варьирования и механизмы: автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 1989. 42 с.

Титов А. Ф., Акимова Т. В., Таланова В. В., Топчиева Л. В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука, 2006. 143 с.

Топчиева Л. В. Сравнительное изучение реакции растений на действие высоких закаливающих и повреждающих температур: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 1994. 19 с.

Чиркова Т. В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2002. 244 с.

Bitá C. E., Gerats T. Plant tolerance to high temperature in changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops // J. Frontiers in plant science. Crop science and horticulture. 2013. Vol. 4. P. 1–18.

Wahid A., Gelani S., Ashraf M., Floodad M. R. Heat tolerance in plants: An overview // J. Environmental and Experimental Botany. 2007. Vol. 61. P. 199–223.

Nilova, Irina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: im-ira@mail.ru
tel.: (8142) 762712

Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: titov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769710

УДК [577.161.1 + 577.161.3]:591.461:599

СОДЕРЖАНИЕ ВИТАМИНОВ А И Е В КОРКОВОМ И МОЗГОВОМ СЛОЯХ ПОЧЕК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Т. Н. Ильина, И. В. Баишникова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В корковом и мозговом слоях почек млекопитающих (крыса, норка, песец, лисица) методом жидкостной хроматографии исследовали содержание витаминов А (ретинол) и Е (α -токоферол). Уровень витамина А в корковом слое у всех животных был значительно выше, чем в медуллярном. Оба слоя почки хищных млекопитающих характеризовались более высоким содержанием витамина А, чем почки крысы. Четких различий между слоями в распределении токоферола обнаружено не было. В то же время уровень токоферола в обоих слоях почки был высоким у всех исследованных видов млекопитающих.

К л ю ч е в ы е с л о в а: витамины А и Е, млекопитающие, почки, корковый и мозговой слои.

T. N. Ilyina, I. V. Baishnikova. VITAMINS A AND E CONTENT IN THE CORTICAL AND MEDULLARY KIDNEY LAYERS OF MAMMALS

The vitamins A (retinol) and E (α -tocopherol) concentration in the cortical and medullary kidney layers of mammals (rat, mink, polar fox, fox) was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Vitamin A concentration in the renal cortex of all animals was significantly higher than in the renal medulla. Both renal layers of the carnivorous mammals were characterized by a higher vitamin A concentration than rat kidneys. No clear differences between layers in tocopherol distribution were detected, but tocopherol concentration in both renal layers was high in all studied species of mammals.

K e y w o r d s: vitamins A and E, mammals, kidney, cortical and medullary layers.

Введение

Для поддержания на физиологическом уровне концентрации активных форм кислорода, необходимых для ряда биохимических процессов в клетке, эволюционно сложилась антиоксидантная система. Неферментативное звено этой системы представлено низкомолекулярными антиоксидантами, к которым относятся витамины А и Е. Адаптация к различным факторам среды сопровождается из-

менением антиокислительной активности липидов, которая зависит от содержания в них основного природного антиоксиданта – витамина Е, входящего вместе с витамином А в группу так называемых «пищевых антиоксидантов», потребность в которых удовлетворяется поступлением с пищей, а недостаток приводит к развитию свободнорадикальной патологии с характерными клиническими проявлениями [Надилов, 1991; Меньщикова и др., 2006].

Почки играют важную роль в поддержании гомеостаза организма и обеспечении его адаптации к условиям внешней среды. У млекопитающих почки – это образования бобовидной формы, на поперечном срезе которых можно различить корковое и мозговое вещество. Корковое представлено главным образом почечными клубочками, а мозговое — канальцевыми частями нефронов. Если основной функцией коркового вещества является первичная фильтрация мочи, то функция мозгового слоя – выведение и распределение продуктов фильтрации. Имеющиеся в литературе данные указывают на неодинаковый уровень процессов перекисного окисления липидов в корковом и мозговом слоях почек разных видов животных, что связывают с различиями в уровне как ферментных [Chen et al., 2003], так и неферментных [Никифорова и др., 1993] компонентов антиоксидантной системы. В представленных ранее работах, выполненных на лабораторных животных, имеются данные о распределении между корковым и мозговым слоями почек низкомолекулярных антиоксидантов витаминов А и Е [Никифорова и др., 1993; Raila et al., 2001]. Однако немногочисленность подобных исследований оставляет открытым вопрос, насколько полученные результаты характерны для разных видов млекопитающих. Поэтому в настоящей работе исследовалось содержание витаминов А и Е в корковом и мозговом слоях почек не только лабораторных животных (крыса), но и введенных в зоокультуру (норка, песец, лисица), подобные исследования на которых ранее не проводились.

Материалы и методы

Исследовались почки лабораторных крыс линии ЛИО ($n = 4$), а также норки ($n = 3$), песцов ($n = 4$) и серебристо-черных лисиц ($n = 4$) клеточного содержания. Почки после забора промывали физиологическим раствором, выделяли корковое и мозговое вещество. Образцы тканей замораживали и хранили при температуре -25°C до проведения анализа, для которого готовили гомогенат ткани, используя в качестве суспендирующей среды 0,25 М раствор сахарозы. К гомогенату добавляли 0,025%-й раствор бутилокситолуола в этиловом спирте и тщательно смешивали для осаждения белков. Приливали 0,0125%-й раствор бутилокситолуола в н-гексане, встряхивали 5 мин, затем центрифугировали 10 минут при 3000 об./мин. Пробу для хроматографического анализа отбирали из верхнего гексанового слоя. Определение концентрации ви-

таминов А (ретинол) и Е (α -токоферол) проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [Скурихин, Двинская, 1989]. Использовали колонку с прямой фазой, заполненную сорбентом с размером частиц 5 мкм, элюентом служила смесь гексана с изопропанолом в соотношении 98,5:1,5. Детектирование анализируемых компонентов проводили при 292 нм для α -токоферола и 324 нм для ретинола. Для построения калибровочных кривых использовали стандартные растворы α -токоферола и ретинола («Sigma»). Полученные результаты обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики.

Исследования выполнены с использованием приборной базы Центра коллективного пользования научным оборудованием Института биологии КарНЦ РАН.

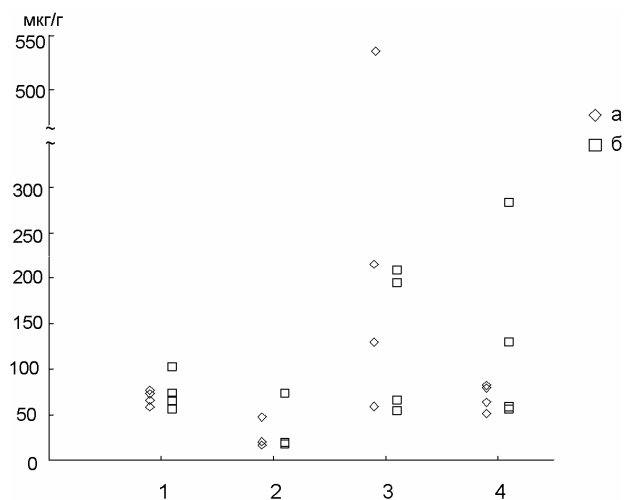
Результаты и обсуждение

У всех исследованных видов животных содержание витамина А в корковом веществе почек было в 1,5–3 раза выше, чем в мозговом. В то же время его уровень как в корковом, так и в мозговом слоях у песцов и лисиц был выше, чем у норки, а у каждого из этих видов – значительно выше (от 16 до 49 раз), чем у крысы (табл.). Общее содержание витаминов в тканях млекопитающих связано с их видовой принадлежностью [Crissey et al., 2001; Ильина, 2008]. Считают, что высокий уровень витамина А в ткани почек собачьих, к которым относятся песец и лисица, указывает на важную роль этого органа в метаболизме витамина А у представителей данного семейства. Установлено, что собачьи выделяют значительные количества ретинола и его эфиров с мочой [Schweigert et al., 1996]. Избыток витамина А токсичен для организма, и выведение его органом, для которого процесс поддержания постоянства физико-химических констант жидкостей внутренней среды является основной функцией, совершенно естественно. Питание животных определяет у них уровень переносящего ретинол ретинолсвязывающего белка, транспортером которого является преальбумин или транстиретин [Raila et al., 2001]. Регулирующая роль почек опосредуется клу-

Содержание витаминов А и Е в корковом и мозговом слоях почек млекопитающих, ($M \pm \delta$)

Животные	Витамин А, мкг/г		Витамин Е, мкг/г	
	слой почки			
	корковый	мозговой	корковый	мозговой
Крыса	1,25 ± 0,17	0,585 ± 0,03	68,43 ± 7,06	74,25 ± 17,24
Норка	29,0 ± 7,73	9,4 ± 2,91	28,17 ± 13,82	37,07 ± 25,56
Лисица	42,33 ± 6,66	29,73 ± 4,08	234,45 ± 181,81	130,88 ± 70,82
Песец	47,33 ± 20,12	25,08 ± 17,73	69,13 ± 12,35	131,9 ± 92,38

бочковой фильтрацией, резорбцией и секрецией протеинсвязанных витаминов. В физиологических условиях транстретин с ретинолсвязывающим белком образуют играющий важную функциональную роль комплекс, предотвращая тем самым гломерулярную фильтрацию ретинолсвязывающего белка в почках, а следовательно, и потерю витамина А с мочой. Ретинол в таком комплексе очень стабилен и недоступен веществам, быстро реагирующим с ним в свободном состоянии. Витамин-транспортные белки фильтруются в почечных клубочках и в дальнейшем подвергаются реабсорбции в проксимальных канальцах путем эндоцитоза [Raila, Schweigert, 2001]. Вероятно, эти процессы и определяют высокое содержание в корковом слое витамина А, установленное у всех исследованных животных. Подобная закономерность была также обнаружена в почках домашних кошек [Raila et al., 2001]. Установленный у плотоядных – норки, песца и лисицы – уровень витамина А, во много раз превосходящий его содержание в обоих слоях почек крысы, связан, очевидно, как с алиментарными факторами, так и с видовыми особенностями животных.



Распределение содержания α -токоферола между корковым и мозговым слоями почки млекопитающих:

а – корковый слой, б – мозговой слой; 1 – крыса, 2 – норка, 3 – лисица, 4 – песец

Содержание α -токоферола в мозговом веществе почек крысы, норки и песца в среднем было выше, чем в корковом, что характерно для других видов млекопитающих [Никифорова и др., 1993]. Проведенные ранее исследования показали также неодинаковое распределение активности антиоксидантных ферментов в корковом и мозговом слоях почек: так, активность супероксиддисмутазы в

мозговом слое крыс была выше, чем в корковом [Chen, 2003]. В то же время в нашем исследовании четких различий между слоями в распределении α -токоферола обнаружено не было (рис.). Анализ индивидуальных данных показал, что у отдельных животных характер распределения токоферола между слоями изменялся в сторону как медуллярного, так и коркового слоя, что отразилось на высокой степени вариабельности.

Основным фактором, определяющим потребность в токофероле, является содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПЖК) в тканях, состав которых и, соответственно, уровень метаболизма липофильных соединений существенно отличаются у разных видов животных [Надилов, 1991; Меньщикова и др., 2006]. Роль почки в липидном обмене состоит в том, что в ее ткани свободные жирные кислоты включаются в состав триацилглицеринов и фосфолипидов и в виде этих соединений поступают в циркуляцию. Окисление жирных кислот в значительной степени обеспечивает работу почки [Ноздрачев и др., 2001]. При этом и количество ПЖК в липидах, и количество самих липидов влияют на степень накопления данных кислот в тканях. Потребление кислорода организмом зависит от уменьшения содержания ПЖК, так как он расходуется на образование пероксида в фосфолипидах – функционально активной структуре мембран. В то же время уровень витамина Е зависит от интенсивности этих процессов в почках животных, особенности функционирования которых у систематически разных видов могут оказывать влияние на энергетический обмен как всего органа, так и его частей [Ильина и др., 2008]. Способность токоферола раньше других антиоксидантов расходоваться в окислительных реакциях приводит, вероятно, к его большему по сравнению с витамином А варьированию в обоих слоях почки, так как биологическая активность витамина Е как антиоксиданта значительно выше. Проведенный многофакторный дисперсионный анализ позволил установить, что основным фактором, влияющим на уровень витамина Е в тканях, была видовая принадлежность животного, в то время как для витамина А – слой почек, в котором проводилось определение его содержания.

Таким образом, имеющиеся различия уровня витаминов А и Е в корковом и мозговом слоях следует, видимо, рассматривать как наследственно закрепленную реакцию организма млекопитающих, обусловленную разницей в интенсивности обменных процессов в почках.

Тот факт, что содержание витаминов А и Е в корковом и мозговом слоях неодинаково, позволяет говорить о разном уровне их повреждаемости у различных видов млекопитающих и участии в обеспечении устойчивости антиоксидантной системы почки в ответ на действие факторов среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП ГК № 02.740.11.0700.

Литература

- Ильина Т. Н., Руоколайнен Т. Р., Белкин В. В. Содержание токоферола в тканях млекопитающих различного экогенеза // Журн. эвол. биохимии и физиологии, 2008. Т. 44, № 6. С. 577–581.
- Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М., 2006. 556 с.
- Надиров Н. К. Токоферолы и их использование в медицине и сельском хозяйстве. М., 1991. 336 с.
- Никифорова Н. В., Кирпатский В. И., Севрюков Е. А. Содержание витамина Е в корковом и мозговом слоях почек млекопитающих // Бюл. exper. биол. и медицины. 1993. № 3. С. 245–246.
- Ноздрачев А. Д., Баженов Ю. И., Баранникова И. А. и др. Начала физиологии. СПб., 2001. 1088 с.
- Скурихин В. Н., Двинская Л. М. Определение α-токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии // С.-х. биология. 1989. № 4. С. 127–129.
- Chen C.-F., Tsai S.-Y., Ma M.-C., Wu M.-S. Hypoxic preconditioning enhances renal superoxide dismutase levels in rats. // J. Physiol. 2003. 552.2. P. 561–569.
- Crissey S., Ange K., Slifka K., Bowen P., Stacewicz-Sapuntzakis M., Langman C., Sadler W., Ward A. Serum concentrations of vitamin D metabolites, vitamins A and E, and carotenoids in six canid and four ursid species at four zoos. // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 2001. Vol. 128, N 1. P. 155–165.
- Raila J., Mathews U., Schweigert F. J. Plasma transport and tissue distribution of β-carotene, vitamin A and retinol-binding protein in domestic cats // Comparative Biochemistry and Physiology Part A 130. 2001. P. 849–856.
- Raila J., Schweigert F. J. Zur Bedeutung der Nieren im Vitamin-Stoffwechsel. // Berlin. und munch. tierarztl. Wochenschr. N 7-8, 2001, 114, S. 257–266.
- Schweigert F. J., Thomann E. Organ distribution of vitamins A and E in carnivores // Scientifur. 1995. Vol. 19, N 4. P. 309.
- Schweigert F. J., Ryder O. A., Rambeck W. A., Zucker H. The majority of vitamin A is transported as retinyl esters in the blood of most carnivores // Scientifur. 1996. Vol. 20, N 1. P. 95–96.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ильина Татьяна Николаевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ilyina@bio.krc.karelia.ru
тел.: (1842) 573107

Баишникова Ирина Валерьевна

ведущий биолог
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: iravbai@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Ilyina, Tatiana

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ilyina@bio.krc.karelia.ru
tel.: (1842) 573107

Baishnikova, Irina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: iravbai@mail.ru
tel.: (8142) 573107

УДК 577.112.385:636.087.73

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ЩЕНКОВ АМЕРИКАНСКОЙ НОРКИ (*MUSTELA VISON*) ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКСТРАКТА ИЗ ОБОГАЩЕННОЙ L-АРГИНИНОМ ХВОИ

**А. Р. Унжаков¹, Н. Н. Тютюнник¹, Л. Б. Узенбаева¹, И. В. Баишникова¹,
Е. П. Антонова¹, Н. П. Чернобровкина², Е. В. Робонен², В. А. Илюха¹**

¹Институт биологии Карельского научного центра РАН

²Институт леса Карельского научного центра РАН

Установлено, что экстракт из биомассы хвои 10-летней сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), содержащий разные дозы L-аргинина, оказывает положительное влияние на жизнеспособность, рост и развитие ослабленных щенков американской норки. Введение в рацион хвойного препарата двухмесячным щенкам в оптимальных дозах способствует улучшению физиологического состояния, поддерживает высокий уровень неспецифической защитной реакции и костномозгового кроветворения.

К л ю ч е в ы е с л о в а: норка, аргинин, биомасса хвои, жизнеспособность, рост, развитие, гематологические показатели.

**A. R. Unzhakov, N. N. Tyutyunnik, L. B. Uzenbaeva, I. V. Baishnikova,
E. P. Antonova, N. P. Chernobrovkina, E. V. Robonen, V. A. Ilyukha.
PHYSIOLOGICAL STATE OF AMERICAN MINK KITS (*MUSTELA VISON*)
UNDER THE EFFECT OF EXTRACT FROM PINE NEEDLES ENRICHED IN
L-ARGININE**

It was shown that an extract from the needle biomass of 10-year-old *Pinus sylvestris*, containing different doses of L-arginine, had a positive effect on the viability, growth and development of weakened mink kits. The addition of the extract of pine needles to the diet in optimal doses maintains a high level of non-specific defense reactions and activates of bone marrow hematopoiesis.

K e y w o r d s: mink, arginine, biomass of pine needles, viability, growth, development, hematological indices.

Одной из важнейших проблем в физиологии питания млекопитающих является обеспечение животных полноценным и сбалансированным рационом [Черепанов, Кальницкий, 2013]. В условиях технологии интенсивного разведения и содержания в неволе хищных

пушных зверей большое внимание уделяется составу рациона, в частности качеству белков. В силу ряда финансовых проблем в зверохозах для кормления животных часто используются неполноценные по аминокислотному составу корма, что приводит к наруше-

нию метаболизма [Балакирев и др., 2007]. Так, недостаток в рационе незаменимых аминокислот, в т. ч. и L-аргинина, в период беременности и лактации самок норок сказывается на физиологическом состоянии потомства. Щенки от таких самок рождаются нежизнеспособными или ослабленными, у них наблюдаются дистрофические изменения в органах и тканях, замедление роста и развития, изменение функции кроветворения и иммунной системы. В связи с этим поиск биологически активных веществ и кормовых добавок, обеспечивающих повышение жизнеспособности и сохранности ослабленных щенков пушных зверей, в частности норок, является актуальным.

В организме млекопитающих аргинин является предшественником для синтеза не только белков, но и оксида азота, мочевины, цитруллина, полиаминов, пролина, глутамата, креатина и агматина [Wu et al., 2009]. Установлено, что аргинин играет существенную роль при формировании меха у норок [Leoschke, Elvehjem, 1959], и несбалансированность кормовых рационов по микроэлементам и аминокислотам, включая аргинин, может приводить к «стрижке» меха [Супрун, 2005]. Известно, что добавки аргинина оказывают положительное влияние на ростовые процессы, а также на показатели иммунитета.

По отношению к аргинину хищные млекопитающие (*Carnivora*) представляют особую группу. По мнению некоторых авторов [Eisert, 2011], специфический обмен белка и потребность в отдельных аминокислотах хищников связаны с размерами мозга и необходимостью усиления глюконеогенеза для обеспечения мозга глюкозой. Среди этой систематической группы по типу питания и потребности в аргинине выделяют условную группу «гиперхищников». Так, домашние кошки (*Felis silvestris*) могут служить примером «гиперхищников», поскольку являются животными, получающими энергию в основном за счет белка пищи [Holliday, Steppan, 2004; Wang, Tedford, 2008]. В эту же группу кроме кошек включают и норок (*Mustela vison*), обладающих значительно более высокой потребностью в пищевом белке по сравнению со всеядными животными [Greaves, Scott, 1960; Rogers, Morris, 1979; NRC, 1982, 2006; MacDonald et al., 1984; Damgaard et al., 1998].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния препарата из биомассы хвои, содержащего различные дозы L-аргинина, на сохранность, рост, развитие и гематологические показатели у ослабленных щенков американской норки.

Материалы и методы

Работа выполнена с использованием приборно-аналитической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Объектом исследования служили щенки американской норки (*Mustela vison*) зверохозяйства «Пряжинское» Республики Карелия. Все экспериментальные животные содержались на стандартном хозяйственном сбалансированном по основным компонентам рационе, включающем на 100 ккал 8,76–8,97 г переваримого белка, 4,67–4,87 г жира и 3,45–4,04 г безазотистых экстрактивных веществ. В возрасте двух месяцев щенки с учетом массы тела и пола были разделены на 6 групп по 10 щенков (5 самок и 5 самцов) в каждой. Первая контрольная группа была сформирована из числа нормально развивающихся щенков, вторая – из ослабленных, в корм которых препарат из биомассы хвои не вводили. Подопытным животным 3–6-й групп, отстающим в развитии, введение в корм хвойного экстракта с разным содержанием L-аргинина (3,7–10,3 мг/кг массы тела) осуществляли ежедневно в течение 14 дней с 26 июня по 10 июля. Препарат L-аргинина был получен из биомассы хвои 10-летней сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), выращенной при высоком уровне внесения в почву азотного удобрения [Чернобровкина и др., 2010, 2013]. Животных взвешивали и учитывали их сохранность (жизнеспособность) в течение 4 месяцев. Взятие крови проводили после 14-дневного скормливания препарата. Гематологические показатели определяли по стандартным методикам [Берестов, 2005]. Окраску мазков для подсчета лейкоформулы проводили по Паппенгейму–Крюкову [Узенбаева и др., 2004].

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики с применением программного обеспечения Statgraphics 2.0 for Windows. Для сравнения различий между группами использовали параметрический t-критерий Стьюдента и непараметрический критерий Уилкоксона–Манна–Уитни. Сходство групп при многомерном оценивании производили с помощью кластерного анализа [Ивантер, Коросов, 2011; Коросов, Горбач, 2007].

Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и правил проведения работ с использованием экспериментальных животных [Этическая экспертиза..., 2005].

Результаты и обсуждение

Введение в рацион американских норок хвойного экстракта, содержащего аргинин в оптимальных дозах, оказало положительное влияние на динамику и прирост массы тела животных (табл. 1). Наибольший прирост живой массы наблюдался у щенков 4-й и 5-й подопытных групп и составил у самок 189–205 %, а у самцов 199–203 % по сравнению со 2-й контрольной группой. В 3-й и 6-й подопытных группах положительный эффект добавки на прирост массы тела был менее выраженным. Максимальная масса тела к концу эксперимента среди подопытных животных выявлена в 4-й и 5-й группах, в которых щенки получали хвойный препарат с оптимальным содержанием L-аргинина. К началу октября масса тела у самок и самцов подопытных животных находилась в пределах показателей 1-й контрольной группы. В 3-й и 6-й подопытных группах как у самок, так и у самцов под влиянием добавки ростостимулирующий эффект был менее выраженным.

Установлено, что к концу опыта сохранность щенков 1-й контрольной группы (нормальные щенки) составила 80 %, что сопоставимо с обычными результатами для норок [Dunstone, 1993]. В то же время во 2-й контрольной группе (ослабленные щенки) выживаемость щенков составила всего 30 %. Наиболее высокая сохранность щенков (50–60 %) выявлена в 4-й и 5-й

группах, которые получали хвойный экстракт с оптимальным содержанием L-аргинина.

Содержание эритроцитов и уровень гемоглобина у обследованных норок (табл. 2) соответствовали нормальным значениям, характерным для данного возраста [Берестов, 2005]. Однако наименьшее количество эритроцитов было выявлено у ослабленных щенков 2-й (контрольной) и 3-й (подопытной) групп. При этом у ослабленных щенков в контроле (2-я группа) концентрация гемоглобина также оказалась ниже, чем у нормально развивающихся щенков 1-й группы, и особенно по сравнению с показателями 4-й и 5-й групп. Полученные данные свидетельствуют о том, что введение добавки в оптимальных дозах оказывает выраженное влияние на эритропоэз у ослабленных щенков.

Количество лейкоцитов в периферической крови у исследованных животных находилось на высоком уровне и различия между группами были незначительными. Изменения выявлены в составе лейкоформулы, характеризующей соотношение различных типов клеток. У ослабленных щенков наблюдалось увеличение количества молодых форм – палочкоядерных нейтрофильных лейкоцитов, отражающее активацию костномозгового кроветворения, в то время как у нормально развивающихся щенков, за некоторым исключением, содержание незрелых нейтрофилов находилось в пределах нормы. Относительно высокое ко-

Таблица 1. Влияние препарата из биомассы хвои, содержащего L-аргинин в разных дозах, на динамику массы тела щенков американской норки, г ($M \pm m$)

Дата взвешивания	Группы					
	1	2	3	4	5	6
	Контрольные щенки		Подопытные ослабленные щенки			
	нормальные	ослабленные	(доза препарата: 3,7–10,3 мг/кг массы тела) *			
Самки						
26 июня	423 ± 10	308 ± 24	291 ± 33	279 ± 24	288 ± 26	301 ± 40
10 июля	485 ± 39	295 ± 57	355 ± 59	286 ± 21	346 ± 32	322 ± 48
26 июля	617 ± 29	418 ± 45	393 ± 94	551 ± 93	490 ± 30	418 ± 111
10 августа	1104 ± 67	520 ± 57	641 ± 165	1068 ± 128 ²	1119 ± 65 ³	909 ± 109 ¹
10 октября	1562 ± 102	989 ± 53	1244 ± 270	1571 ± 52 ³	1687 ± 89 ³	1310 ± 123 ¹
	Прирост массы тела, г – по сравнению с исходными данными					
	1139	681	953	1292	1399	1009
	Прирост массы тела, в % по отношению к контролю (ослабленные щенки)					
	167	100	140	189	205	148
Самцы						
26 июня	478 ± 53	303 ± 37	344 ± 19	370 ± 20	355 ± 26	338 ± 80
10 июля	539 ± 71	375 ± 56	368 ± 28	361 ± 81	437 ± 45	421 ± 77
26 июля	734 ± 63	422 ± 42	470 ± 57	498 ± 32	630 ± 25	511 ± 46
10 августа	1709 ± 169	707 ± 42	937 ± 60 ¹	1458 ± 132 ²	1623 ± 32 ³	887 ± 21
10 октября	1847 ± 125	1033 ± 74	1523 ± 163 ¹	1827 ± 73 ³	1835 ± 29 ³	1599 ± 142 ¹
	Прирост массы тела, г – по сравнению с исходными данными					
	1369	730	1179	1457	1480	1261
	Прирост массы тела, в % по отношению к контролю (ослабленные щенки)					
	187	100	163	199	203	173

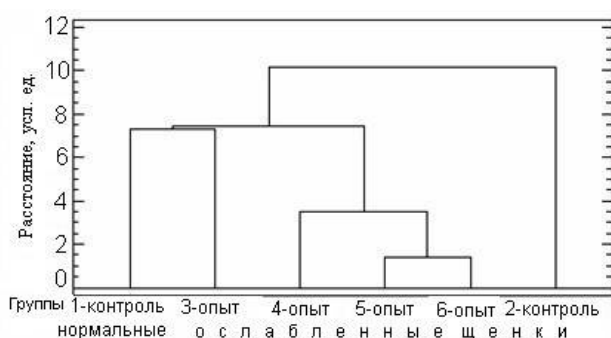
Примечание. * – по материалам исследований подана заявка на изобретение в ФИПС, которая находится в стадии рассмотрения. ¹ – ($p < 0,05$), ² – ($p < 0,01$), ³ – ($p < 0,001$) – изменения достоверны по сравнению с контрольной группой ослабленных щенков.

Таблица 2. Влияние препарата из биомассы хвои, содержащего L-аргинин в разных дозах, на гематологические показатели щенков американской норки, ($M \pm m$)

Показатели	Группы					
	1	2	3	4	5	6
	Контрольные щенки		Подопытные щенки			
	нормальные	ослабленные	доза препарата: 3,7–10,3 мг/кг массы тела			
Эритроциты, $10^{12}/л$	$7,3 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,2$
Гемоглобин, г/100 мл	$16,3 \pm 0,3$	$14,6 \pm 0,5$	$13,7 \pm 0,6$	$17,6 \pm 0,2^2$	$16,7 \pm 0,5^1$	$15,5 \pm 0,8$
Лейкоциты, $10^9/л$	$9,8 \pm 1,0$	$10,4 \pm 1,2$	$9,6 \pm 1,2$	$10,0 \pm 1,8$	$9,8 \pm 0,9$	$9,43 \pm 1,2$
Лимфоциты, %	$21,9 \pm 3,1$	$18,4 \pm 1,8$	$19,8 \pm 3,7$	$23,8 \pm 3,7$	$20,6 \pm 4,2$	$22,1 \pm 3,2$
Моноциты, %	$8,4 \pm 1,6$	$12,4 \pm 5,5$	$11,0 \pm 1,2$	$7,2 \pm 1,6$	$10,0 \pm 1,7$	$9,0 \pm 2,8$
Нейтрофилы палочкоядерные, %	$5,2 \pm 1,5$	$11,0 \pm 2,3$	$10,4 \pm 2,6$	$12,8 \pm 4,9$	$12,4 \pm 1,5$	$17,1 \pm 4,0$
сегментоядерные, %	$63,2 \pm 2,5$	$57,4 \pm 6,9$	$58,4 \pm 3,8$	$55,4 \pm 4,3$	$56,6 \pm 3,2$	$50,7 \pm 3,8$
Эозинофилы, %	$1,0 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,4$	$0,40 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,4$
Базофилы, %	$0,2 \pm 0,2$	0	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$	0	$0,1 \pm 0,2$

Примечание. ¹ – ($p < 0,05$), ² – ($p < 0,01$) – изменения достоверны по сравнению с контрольной группой ослабленных щенков.

личество палочкоядерных нейтрофилов у ослабленных щенков, по-видимому, явилось результатом снижения устойчивости организма и реакции на патоген бактериальной природы. Сравнение суммарного количества нейтрофилов (палочкоядерные и сегментоядерные) показало, что животные, получавшие аргинин, не отличались от щенков контрольных групп. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что аргинин поддерживает неспецифическую защитную реакцию, осуществляемую нейтрофильным звеном лейкоцитов, на высоком уровне. Кластерный анализ показал (рис.), что все применяемые дозы препарата приближали изученные показатели «белой крови» к таковым у контрольной группы здоровых животных.



Дендрограмма сходства различных групп норок по показателям, характеризующим содержание лейкоцитов крови и лейкоформулу (метод ближайшего соседа, в анализ не включались данные по относительному содержанию палочкоядерных нейтрофилов)

Таким образом, добавка в рацион экстракта биомассы хвои, содержащего аргинин, поддерживает у ослабленных щенков норок на высоком уровне неспецифическую защитную реакцию организма, осуществляемую нейтро-

фильным звеном лейкоцитов, обеспечивает повышение концентрации гемоглобина в эритроцитах, а также высокую интенсивность роста и сохранность щенков, что свидетельствует об улучшении их физиологического состояния. Экстракт, полученный из древесной зелени сосны обыкновенной, обогащенной L-аргинином, является натуральным продуктом, содержащим различные биологически активные соединения, и может производиться из отходов лесопромышленного комплекса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий», № гос. регистрации 01201257867, и гранта Президента РФ НШ-1410.2014.4.

Авторы выражают благодарность Э. Ф. Печориной, Т. Н. Ильиной, А. В. Морозову, Е. А. Хижкину, Т. В. Ильиной, О. К. Зайцевой за помощь в проведении экспериментов.

Литература

- Балакирев Н. А., Кладовщиков В. Ф., Демина Т. М., Квартникова Е. Г., Перельдик Д. Н., Растимешина О. В., Лоевко Н. Н., Александрова В. С., Куликов А. Т. Нормы кормления и нормативы затрат кормов для пушных зверей и кроликов: справочное пособие. Москва: ГНУ НИИПЗК им. В. А. Афанасьева, 2007. 185 с.
- Берестов В. А. Клиническая биохимия. Петрозаводск: Карелия, 2005. 160 с.
- Ивантер Э. В., Коросов А. В. Введение в количественную биологию. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2011. 302 с.
- Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных: методическое пособие. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2007. 76 с.

Супрун А. А. Профилактика дефекта «стрижки» волосяного покрова норки // Новые энергосберегающие технологии в зоотехнии и ветеринарии: материалы междунаучного практического семинара. Калининград, 2005. С. 172–178.

Узенбаева Л. Б., Илюха В. А., Тютюнник Н. Н., Голубева А. Г. Морфо-цитохимические исследования лейкоцитов крови пушных зверей. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 2004. 24 с.

Черепанов Г. Г., Кальницкий Б. Д. Проблема взаимосвязи протеина и энергии при оценке потребностей в нутриентах и разработке систем питания продуктивных животных // Проблемы биологии продуктивных животных. 2013. № 2. С. 5–35.

Чернобровкина Н. П., Робонен Е. В., Зайцева М. И. Накопление L-аргинина в хвое сосны обыкновенной при регуляции азотного и борного обеспечения // Химия растительного сырья. 2010. № 3. С. 71–75.

Чернобровкина Н. П., Робонен Е. В., Морозов А. К., Макарова Т. Н. Накопление L-аргинина в хвое ели европейской при регуляции азотного и борного обеспечения // Труды КарНЦ РАН. Серия Экспериментальная биология. 2013. № 3. С. 159–165.

Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации / Под ред. Ю. Б. Белоусова. Москва, 2005. 156 с.

Damgaard B. M., Clausen T. N., Dietz H. H. Effect of dietary protein levels on growth performance, mortality rate and clinical blood parameters in mink (*Mustela vison*) // Acta Agric. Scand. A Anim. 1998. Vol. 48. P. 38–48.

Dunstone N. The mink., London: T&AD Poster natural history, 1993. 232 p.

Eisert R. Hypercarnivory and the brain: protein requirements of cats reconsidered // J. Comp. Physiol. B. 2011. Vol. 181. P. 1–17.

Greaves J. P., Scott P. P. Nutrition of the cat // Br. J. Nutr. 1960. Vol. 14. P. 361–369.

Holliday J. A., Steppan S. J. Evolution of hypercarnivory: the effect of specialization on morphological and taxonomic diversity // Paleobiology 2004. Vol. 30. P. 108–128.

Leoschke W. L., Elvehjem C. A. The importance of arginine and methionine for the growth and fur development of mink fed purified diets // J. Nutr. 1959. Vol. 89. P. 147–150.

MacDonald M. L., Rogers Q. R., Morris J. G. Nutrition of the domestic cat, a mammalian carnivore // Annu Rev. Nutr. 1984. Vol. 4. P. 521–562.

National Research Council Nutrient requirements of dogs and cats. National Academies Press, Washington, DC. 2006 (в тексте – NRC).

National Research Council Nutrient requirements of mink and foxes. National Academy Press, Washington, DC. 1982 (в тексте – NRC).

Rogers Q. R., Morris J. G. Essentiality of amino acids for the growing kitten // J. Nutr. 1979. Vol. 109. P. 718–723.

Wang X. M., Tedford R. H. How dogs came to run the world // Nat. Hist. 2008. Vol. 117. P. 18–23.

Wu G., Bazer F. W., Davis T. A., Kim S. W., Li P. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease // Amino Acids. 2009. Vol. 37. P. 153–168.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Унжаков Алексей Рудольфович

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: uar@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Тютюнник Николай Николаевич

главный научный сотрудник, д. с.-х. н., профессор
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: tyutyunnik@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Узенбаева Людмила Борисовна

старший научный сотрудник к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910,
эл. почта: uzenb@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Баишникова Ирина Валерьевна

главный биолог, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910,
эл. почта: iravbai@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Unzhakov, Alexei

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: uar@bio.krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

Tyutyunnik, Nikolay

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: tyutyunnik@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

Uzenbaeva, Lyudmila

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: uzenb@bio.krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

Baishnikova, Irina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: iravbai@mail.ru
tel.: (8142) 573107

Антонова Екатерина Петровна

стажер-исследователь
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910,
эл. почта: antoonkina@rambler.ru
тел.: (8142) 573107

Чернобровкина Надежда Петровна

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910,
эл. почта: chernobr@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

Робонен Елена Вильямовна

ведущий физик
Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910,
эл. почта: er51@bk.ru
тел.: (8142) 768160

Илюха Виктор Александрович

зав. лаб. экологической физиологии животных, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ilyukha@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Antonova, Ekaterina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: antoonkina@rambler.ru
tel.: (8142) 573107

Chernobrovkina, Nadezhda

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: chernobr@krc.karelia.ru,
tel.: (8142) 768160

Robonen, Elena

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: er51@bk.ru,
tel.: (8142) 768160

Ilyukha, Victor

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ilyukha@bio.krc.karelia.ru
tel.: (8142) 573107

УДК: 612.422:612.017.1:616-006.6:616.37-002

АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ПАТОЛОГИЯХ, СОПРОВОЖДАЮЩИХСЯ РАЗВИТИЕМ ИММУННОЙ СУПРЕССИИ

**Г. А. Жулай¹, Е. К. Олейник¹, П. Н. Кравченко¹, А. В. Чуров¹,
В. М. Олейник¹, А. В. Головин², В. А. Толлер³, К. А. Островский⁴,**

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² ГБУЗ Республиканский онкологический диспансер

³ ГБУЗ Больница скорой медицинской помощи,

⁴ НУЗ Отделенческая клиническая больница на ст. Петрозаводск

Проведена оценка изменений клеточного иммунитета у лиц с заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), патогенез которых сопровождается формированием иммунной супрессии: больные колоректальным раком (КРР, $n = 20$) и больные тяжелым острым панкреатитом (ОП, $n = 16$). Контрольную группу составили 14 здоровых доноров. У больных были отмечены признаки развития вторичного иммунодефицита, снижено содержание некоторых популяций лимфоцитов по сравнению с контролем. Показан сдвиг иммунорегуляторного индекса в сторону его снижения. Интересно отметить, что и при развитии КРР, и при ОП у больных было повышено содержание периферических $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторных Т-клеток (Treg) по сравнению с контролем.

К л ю ч е в ы е с л о в а: лимфоциты, Treg-клетки, FOXP3, колоректальный рак, острый панкреатит, иммунная супрессия.

**G. A. Zhulai, E. K. Oleinik, P. N. Kravchenko, A. V. Churov, V. M. Oleinik,
A. V. Golovin, V. A. Toller, K. A. Ostrovskii. ANALYSIS OF CELLULAR
IMMUNITY IN PATHOLOGIES ACCOMPANIED BY THE DEVELOPMENT OF
IMMUNE SUPPRESSION**

Changes in cellular immunity in patients with gastrointestinal diseases, where the pathogenesis is accompanied by the formation of immune suppression: patients with colorectal cancer (CRC, $n = 20$) and patients with severe acute pancreatitis (AP, $n = 16$), were assessed. The control group consisted of 14 healthy donors. Indications of a developing secondary immunodeficiency were observed in patients. The content of some lymphocyte subsets was reduced in comparison with the control. The immunoregulatory index shifted downwards. It is noteworthy that the content of peripheral $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Treg cells in both CRC and AP patients increased in comparison with the control.

K e y w o r d s: lymphocytes, Treg cells, FOXP3, colorectal cancer, acute pancreatitis, immune suppression.

Введение

К настоящему времени установлено, что развитие и элиминация любого патологического процесса в организме происходит с участием механизмов иммунологической защиты. Одним из таких механизмов является индукция иммунной супрессии опухолевыми клетками при канцерогенезе. Известно, что опухоль и ее микроокружение способны привлекать различные клетки иммунной системы, изменять их функции и фенотип и стимулировать продукцию ряда супрессорных факторов для ускользания от адекватной противоопухолевой иммунной реакции [Бережная, 2009]. Особую роль в этом отношении отводят популяции Treg-клеток, которые в норме поддерживают иммунологическую толерантность к собственным антигенам посредством подавления функций широкого ряда иммунокомпетентных клеток [Sakaguchi et al., 2010].

В вопросе взаимодействия иммунной системы и опухоли активно исследуются лимфоидные клетки, инфильтрирующие микроокружение опухоли, однако данных, характеризующих состояние периферических лимфоцитов, мало. Исследование особенности распределения системы циркулирующих лимфоцитов у онкологических больных, в частности Treg-клеток, представляется интересным в сравнении с другой патологией, также сопровождающейся развитием иммунной супрессии. В данной работе предлагается рассмотреть основные популяции лимфоцитов и Treg-клетки у лиц с патологией ЖКТ: больных КРР и больных ОП.

ОП характеризуется воспалением поджелудочной железы с возможным вовлечением перипанкреатических тканей и формированием полиорганной функциональной недостаточности, которая в свою очередь может возникать вследствие панкреонекроза, присутствия инфекции или сепсиса [Mofleh, 2008]. Последние исследования демонстрируют, что развитие ОП тесно связано с нарушением равновесия в иммунных механизмах, особенно в регуляции Т-хелперов (Th)1/Th2 и секреции ими цитокинов. Было показано, что тяжелый ОП сопровождается индукцией иммунной супрессии, которая может

способствовать развитию вторичной инфекции и ухудшать состояние больного [Li et al., 2013; Ueda et al., 2006]. Однако данных о содержании и функционировании Treg-клеток у больных ОП в литературе немного. Поэтому целью настоящей работы являлось сравнительное изучение популяций периферических лимфоцитов, в частности Treg-клеток, у больных КРР и ОП.

Материалы и методы

В работе исследовано 50 образцов периферической крови человека. Группу больных с тяжелым ОП составили 16 человек в возрасте от 22 до 83 лет, среди которых 7 больных имели деструктивную форму (табл.). Диагноз поставлен на основе классификации, принятой на IX Всероссийском съезде хирургов в 2000 году. Забор крови осуществляли на 1–10-е сутки после поступления на лечение, до оперативного вмешательства. В группу больных КРР вошли 20 человек в возрасте от 44 до 83 лет на разных стадиях развития опухоли (см. табл.). Забор крови проводили также до хирургического вмешательства. Контрольную группу составили 14 здоровых доноров в возрасте от 25 до 65 лет. Анализ содержания основных популяций лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500, с применением программного обеспечения СХР 2.0 («Beckman Coulter», США). Для оценки экспрессии клетками мембранных маркеров использовали моноклональные антитела CD3-PE, CD19-FITC, CD16-FITC (ООО «Сорбент», Москва), CD4-FITC, CD8-FITC, CD25-PC5 («Beckman Coulter», Франция). Определение Treg-клеток осуществляли по фенотипу $CD4^+CD25^+FOXP3^+$, с использованием моноклональных антител к FOXP3 и растворов для пермеабилзации производства «eBioscience», США. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «BioStat 5.8.4», достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$.

Исследование выполнено с применением оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Характеристика обследованных групп

	Здоровые доноры	Больные острым панкреатитом	Больные колоректальным раком
Количество обследованных лиц	14	16	20
Средний возраст, лет	$40,8 \pm 13$	$44,8 \pm 17$	$66,8 \pm 10$
Пол, мужчины/женщины	5/8	13/3	7/13
Развитие панкреонекроза, n	–	7 (43,8 %)	–
Развитие опухоли, n			
I-II стадии	–	–	7 (35 %)
III стадия			6 (30 %)
IV стадия			7 (35 %)

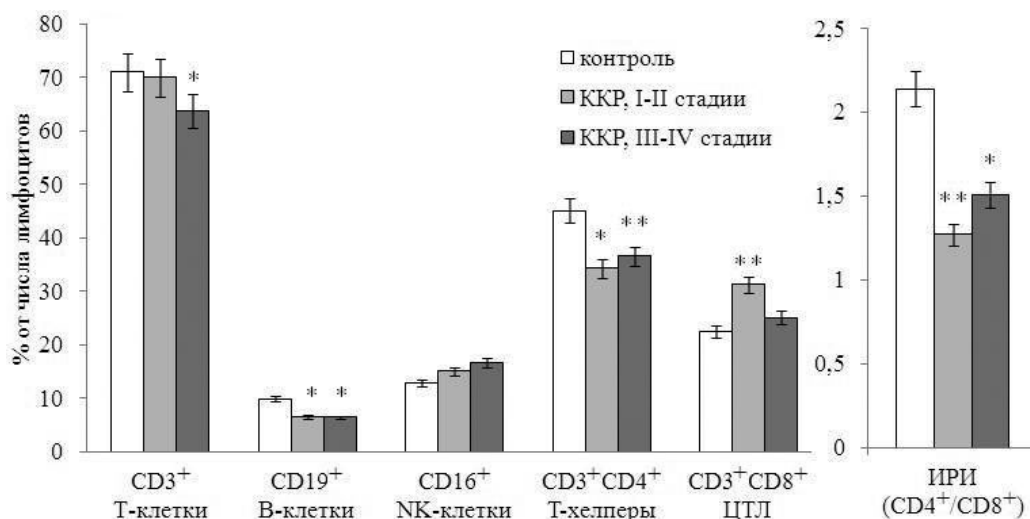


Рис. 1. Содержание популяций лимфоцитов в периферической крови больных колоректальным раком на разных стадиях болезни, % от общего числа лимфоцитов.

Здесь и далее: * – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$; ** – различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,01$

Результаты и обсуждение

Для определения изменений, происходящих в клеточном иммунитете у больных с исследуемыми заболеваниями ЖКТ, было проанализировано относительное количество $CD3^+$ Т-лимфоцитов, $CD19^+CD3^+$ В-лимфоцитов и $CD16^+CD3^+$ натуральных киллеров (NK). Также была проведена оценка субпопуляций Т-клеток: Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ, $CD3^+CD8^+$). Было показано, что у больных КРР по сравнению с контролем снижено число В-лимфоцитов (рис. 1).

Количество циркулирующих Т-лимфоцитов у больных КРР на начальных стадиях развития опухоли (I-II стадии) не отличалось от контроля, тогда как у больных с III-IV стадиями КРР Т-клеток было меньше. В отношении NK-клеток у больных КРР намечена тенденция к увеличению их количества при прогрессии заболевания, однако достоверных различий по сравнению с контролем не выявлено. Значительные изменения наблюдались в субпопуляционном составе Т-клеток. Так, иммунорегуляторный индекс (ИРИ), отражающий баланс $CD4^+/CD8^+$ Т-клеток, у больных КРР был ниже контрольных значений. Причем на начальных стадиях развития опухоли его снижение происходило за счет меньшего числа $CD4^+$ Т-хелперов и повышенного количества $CD8^+$ ЦТЛ. Увеличение относительного числа $CD8^+$ Т-клеток может выявляться в случаях массивного поступления антигена, в том числе и онкогена, когда в его элиминации задействованы антигенспецифические механизмы. К тому же именно цитотоксическая активность $CD8^+$

Т-клеток играет важную роль в противоопухолевом иммунном ответе [Ling et al., 2007]. При исследовании периферических $CD8^+$ Т-клеток на более поздних стадиях заболевания нами показано, что их содержание было на уровне нормы (см. рис. 1). Однако ИРИ у таких больных также оставался ниже контроля в основном за счет значительного уменьшения числа $CD4^+$ Т-клеток. При этом у больных КРР наблюдалось сниженное по сравнению с контролем содержание активированных $CD4^+CD25^+$ Т-клеток на всех стадиях развития болезни (рис. 2). Полученные данные, а также литературные сведения [Seretis et al., 2014] свидетельствуют о том, что у больных КРР в процессе канцерогенеза происходит ослабление иммунной реакции, что может способствовать прогрессии болезни.

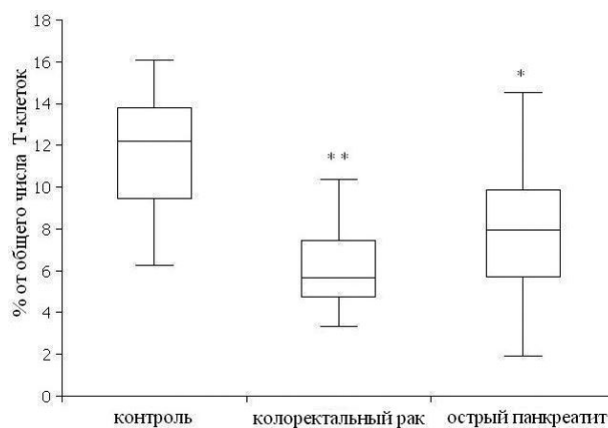


Рис. 2. Содержание активированных $CD4^+CD25^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови больных КРР и ОП, % от общего числа лимфоцитов

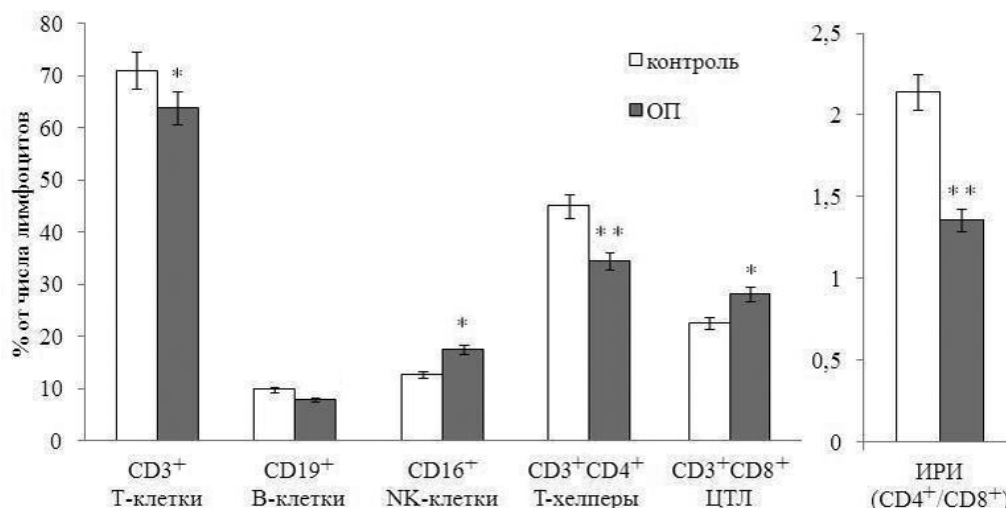


Рис. 3. Содержание популяций лимфоцитов в периферической крови больных острым панкреатитом, % от общего числа лимфоцитов

У обследованных больных ОП также наблюдались признаки вторичного иммунодефицита. Было показано, что содержание Т-лимфоцитов и CD4⁺ Т-клеток ниже, чем в контроле (рис. 3). Количество активированных Т-хелперов также было снижено по сравнению с таковым у здоровых доноров (см. рис. 2). Изменения в соотношении субпопуляций Т-клеток отразились в значительном снижении ИРИ. Отмечено, что наряду с увеличенным числом CD8⁺ ЦТЛ у больных ОП было повышено содержание NK-клеток по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать о том, что в иммунную реакцию при ОП включаются и специфические, и неспецифические механизмы элиминации антигена.

Природа иммунной недостаточности при остром панкреатите кроется в нарушении баланса продукции цитокинов Th1 и Th2, что приводит к их одновременной гиперпродукции. Это влечет за собой запуск каскада реакций, приводящих к чрезмерному иммунному ответу. При развитии заболевания усиленная активация иммунокомпетентных клеток сменяется увеличением уровня апоптоза периферических лимфоцитов, что, вероятно, и приводит к снижению их количества [Zhang et al., 2009]. Снижение числа циркулирующих Т- и В-лимфоцитов у больных ОП отмечается и в работах других авторов [Pietruczuk et al., 2006; Ueda et al., 2006; Li et al., 2013].

При анализе содержания Treg-клеток у больных КРП было обнаружено, что число периферических CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Т-клеток у больных (n = 20) выше, чем в контроле (5,31 ± 2,7 % и 3,41 ± 0,8 % от CD4⁺ Т-клеток соответственно, p < 0,01). Многие авторы

демонстрируют повышенное количество Treg-клеток у онкологических больных, причем отмечено, что накопление этих субпопуляций происходит в микроокружении опухоли и дренирующих опухоль лимфатических узлах, где их число в несколько раз превышает число периферических Treg-клеток [Salama et al., 2009; Seretis et al., 2014]. Предполагается, что привлечение и стимуляция Treg-лимфоцитов опухолевыми клетками способствует формированию иммунной супрессии, которая рассматривается в качестве одного из важных механизмов уклонения от противоопухолевого иммунного ответа [Yang, Ansell, 2009].

Интересно отметить, что при анализе содержания Treg-клеток у больных ОП (n = 7) также было обнаружено, что их количество в периферической крови выше (7,71 ± 2,1 % от CD4⁺ Т-клеток, p < 0,01), чем в контроле. Увеличение числа циркулирующих Treg-клеток у больных ОП показали также Li J. P. с соавт. при изучении развития иммунной супрессии по мере прогрессирования заболевания [Li et al., 2013]. Учитывая повышенное содержание Treg-клеток, а также воспалительный характер заболевания и увеличение уровня апоптоза циркулирующих лимфоцитов [Zang et al., 2009], можно предположить, что развитие состояния иммунной супрессии у таких больных происходит как компенсаторный механизм, ограничивающий степень развития воспалительной реакции.

Заключение

В результате исследования двух патологий ЖКТ было показано, что при развитии

КРР и ОП происходят изменения в популяционном составе лимфоцитов периферической крови, приводящие к ослаблению иммунного ответа. Эти заболевания имеют разный генез и механизмы формирования, однако их развитие сопровождается иммунной супрессией, при которой происходит активация популяции Трег-клеток, что, по всей видимости, играет немаловажную роль в патогенезе как КРР, так и ОП. Исследования Трег-клеток у таких больных позволят выявить ключевые моменты их регуляторных функций при развитии иммунной супрессии, что в свою очередь позволит найти более эффективные мишени для иммунотерапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-04-98826).

Литература

Бережная Н. М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. I. Клетки и цитокины – участники воспаления // Онкология. 2009. Т. 11, № 1. С. 6–17.

Li J. P., Yang J., Huang J. R. et al. Immunosuppression and the infection in patients with early SAP // Front Biosci. (Landmark Ed). 2013. Vol. 18. P. 892–900.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Жулай Галина Анатольевна

младший научный сотрудник
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: zhgali-111@rambler.ru
тел.: (8142) 769810

Олейник Евгения Константиновна

руководитель группы иммунологии, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: ole@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 769810

Кравченко Полина Николаевна

аспирант
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: k-polina13@mail.ru
тел.: (8142) 769810

Чуров Алексей Викторович

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: achou@yandex.ru
тел.: (8142) 769810

Ling K. L., Pratap S. E., Bates G. J., Singh B. et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients // Cancer Immun. 2007. Vol. 7, N 7.

Mofleh I. A. Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors // World J. Gastroenterol. 2008. Vol. 14. P. 675–684.

Pietruczuk M., Dabrowska M. I., Wereszczynska-Siemiatkowska U. et al. Alteration of peripheral blood lymphocyte subsets in acute pancreatitis // World J. Gastroenterol. 2006. Vol. 12. P. 5344–5351.

Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C. M., Hafler D. A. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system // Nat. Rev. Immunol. 2010. Vol. 10. P. 490–500.

Salama P., Phillips M., Grieu F., Morris M. et al. Tumor-infiltrating FOXP3⁺ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer // J. Clin. Oncol. 2009. Vol. 27. P. 186–192.

Seretis F., Seretis C., Youssef H., Chapman M. Colorectal cancer: seed and soil hypothesis revisited // Anticancer Res. 2014. Vol. 34, N 5. P. 2087–2094.

Ueda T., Takeyama Y., Yasuda T., Shinzeki M. et al. Immunosuppression in patients with severe acute pancreatitis // J. Gastroenterol. 2006. Vol. 41. P. 779–784.

Yang Z. Z., Ansell S. M. The role of Treg cells in the cancer immunological response // Am. J. Immunol. 2009. Vol. 5, N 1. P. 17–28.

Zhang X. P., Chen H. Q., Liu F., Zhang J. Advances in researches on the immune dysregulation and therapy of severe acute pancreatitis // J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2009. Vol. 10, N 7. P. 493–498.

Zhulai, Galina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: zhgali-111@rambler.ru
tel.: (8142) 769810

Oleinik, Evgenia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ole@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 769810

Kravchenko, Polina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: k-polina13@mail.ru
tel.: (8142) 769810

Churov, Alexei

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: achou@yandex.ru
tel.: (8142) 769810

Олейник Виктор Михайлович

старший научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. адрес: scigraph@yandex.ru
тел.: (8142) 769810

Головин Андрей Викторович

врач хирург-онколог
ГБУЗ Республиканский онкологический диспансер
Лососинское ш., 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185002
эл. адрес: ya-pomorin@yandex.ru
тел.: (8142) 764235

Толлер Виктор Артурович

врач-колопроктолог
ГБУЗ Больница скорой медицинской помощи
ул. Кирова, 40, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185031
эл. адрес: vtoller@yandex.ru
тел.: (8142) 766253

Островский Константин Адольфович

врач-ординатор, к. м. н.
НУЗ Отделенческая клиническая больница
на ст. Петрозаводск
пр. Первомайский, 17, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185001
эл. адрес: aost2@mail.ru
тел.: (8142) 714677

Oleinik, Victor

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: scigraph@yandex.ru
tel.: (8142) 769810

Golovin, Andrey

Republican Oncology Center
11 Lososinskaya St., 185002 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ya-pomorin@yandex.ru
tel.: (8142) 764235

Toller, Victor

Hospital of Emergency Care
40 Kirova St., 185031 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: vtoller@yandex.ru
tel.: (8142) 766253

Ostrovskii, Konstantin

Department of clinical hospital at station Petrozavodsk,
17 Pervomaiskaya St., 185001 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: aost2@mail.ru
tel.: (8142) 714677

ЮБИЛЕИ И ДАТЫ

ЛЮДМИЛА БОРИСОВНА УЗЕНБАЕВА (к 70-летию со дня рождения)



13 апреля 2014 г. исполнилось 70 лет кандидату биологических наук, старшему научному сотруднику ИБ КарНЦ РАН, доценту по специальности «Физиология» Людмиле Борисовне Узенбаевой. Она родилась в 1944 г. в Мурманске. После окончания в 1970 г. биологического факультета Петрозаводского государственного университета работает в Институте биологии.

С 1974 по 1976 год Людмила Борисовна обучалась в очной аспирантуре в лаборатории физиологии пушных зверей ИБ КФ АН СССР. В 1980 г. защитила кандидатскую дис-

сертацию на тему «Характеристика фагоцитарной реакции у норок и песцов клеточного разведения».

Область ее научных интересов – сравнительно-видовой аспект морфофункциональной организации лейкоцитов в механизмах устойчивости животных к факторам внешней среды. Людмила Борисовна принимала участие в исследовании роли различных режимов освещения и геропротекторов на устойчивость организма. В настоящее время участвует в комплексном исследовании влияния факторов среды и биологически активных веществ на цитоэнзимологические свойства крови млекопитающих различной экологической специализации. Она является соавтором патента «Средство для улучшения качества меха норок». Ею опубликовано более 160 научных работ.

Наряду с научно-исследовательской работой большое внимание Л. Б. Узенбаева уделяет работе со студентами, осуществляя руководство подготовкой курсовых и дипломных работ, оказывает консультативную помощь студентам при проведении исследований. Будучи микроскопистом от Бога, она прививает любовь к этой нелегкой работе молодым исследователям. Людмила Борисовна постоянно расширяет набор методов исследований морфологии и цитохимии лейкоцитов, использует последние достижения современной науки – она первой в Институте стала использовать компьютерную систему анализа микроскопических изображений.

Поздравляем Людмилу Борисовну с юбилеем, желаем крепкого здоровья, исполнения всех творческих планов, любознательных и инициативных учеников, счастья и надежных друзей!

В. А. Илюха

СПИСОК ОСНОВНЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ Л. Б. УЗЕНБАЕВОЙ

1977. Возрастные изменения фагоцитоза у песцов // Новое в физиологии и биохимии пушных зверей. Петрозаводск. С. 5–17.

О взаимосвязи гуморальных и клеточных факторов естественного иммунитета у пушных зверей // Новое в физиологии и биохимии пушных зверей. Петрозаводск. С. 28–35. (Совместно с Э. Л. Мельник.)

1978. Некоторые закономерности и особенности сезонных изменений фагоцитоза и белой крови у норок и песцов // Новое в физиологии и патологии пушных зверей. Петрозаводск. С. 5–19.

1980. Фагоцитоз крови совхозных норок и песцов в период раннего постнатального онтогенеза // Адаптационные реакции пушных зверей. Петрозаводск. С. 49–57.

1982. Физиологические основы неспецифического иммунитета пушных зверей // Физиологическое состояние пушных зверей и пути его регуляции. Петрозаводск. С. 6–26. (Совместно с В. А. Берестовым, Г. М. Малининой.)

1983. Фагоцитарная реакция крови у песцов и норок. Л.: Наука. 112 с. (Совместно с В. А. Берестовым.)

1987. Цитохимическое определение эстеразной активности в лейкоцитах крови пушных зверей // Методические подходы к изучению физиологии пушных зверей. Петрозаводск. С. 94–101

Цитохимические исследования в гематологии. Определение щелочной фосфатазы в лейкоцитах крови пушных зверей // Методические подходы к изучению физиологии пушных зверей. Петрозаводск. С. 86–94 (Совместно с Е. А. Косенковой.)

1989. Activity of nonspecific alpha – naphthylacetate esterase in the fur bearing animal blood leukocytes // Scientifur. Vol. 13, N 2. P. 101–103

1991. Методическое пособие по оценке функциональной активности лейкоцитов норок. Петрозаводск. 14 с.

Цитохимия ферментов лейкоцитов в условиях метаболической терапии // Метаболическая регуляция физиологического состояния пушных зверей. Петрозаводск: Карельский научный центр АН СССР. С. 23–30. (Совместно с Х. И. Мелдо.)

1993. The connection between biochemical and cytochemical mink blood indices with litter size // Scientifur. Vol. 17, N 1. P. 13–16. (Совместно с V. A. Ilukha, H. I. Meldo.)

Средство для улучшения качества меха норок. Патент N150704 ХРП от 01.04.1993 г. (Совместно с Н. Н. Тютюнником, Л. К. Кожевниковой, М. Н. Бадовской, М. Н. Кондрашовой, Х. И. Мелдо, В. А. Илюхой, А. Р. Унжаковым, В. М. Латашко, Ю. В. Найденовым, Г. Ф. Музыченко.)

1994. Влияние синтетических аналогов простагландинов на цитоэнзимологические свойства крови норок // Проблемы экологической физиологии пушных зверей. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. С. 107–112. (Совместно с Н. Н. Тютюнником.)

Some blood indices of mink nanism // Scientifur. Vol. 18, N 3. P. 157–160. (Совместно с N. N. Tyutyunnik.)

1995. Показатели крови при карликовости у норок // Кролиководство и звероводство. № 3. С. 24. (Совместно с Н. Н. Тютюнником.)

1996. The changes of some blood indices of fur animals in lactation period // Scientifur. Vol. 20, N 3. P. 48–53. (Совместно с L. K. Kozhevnikova, N. N. Tyutyunnik, H. I. Meldo, V. A. Ilukha.)

Устойчивость норок к алеутской болезни в зависимости от величины помета при клеточном разведении // С.-х. биология. № 4. С. 110–113. (Совместно с В. А. Илюхой, Х. И. Мелдо.)

Aleutian disease of mink the population analysis of problem // Animal Prod. Review, Applied Science Reports, 28. P. 193–197. (Совместно с V. A. Ilukha.)

1997. Биохимический мониторинг норок в период лактации // Ветеринария. № 2. С. 48–51. (Совместно с Л. К. Кожевниковой, В. А. Илюхой, Н. Н. Тютюнником, Х. И. Мелдо.)

Адаптогенное влияние янтарной кислоты на организм норок // Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве. Пушчино. С. 205–208. (Совместно с В. А. Илюхой.)

1998. Мидийный гидролизат при алеутской болезни норок // Ветеринария. № 12. С. 21–23. (Совместно с В. А. Илюхой, Н. Н. Тютюнником, Х. И. Мелдо, Ю. А. Бойковым.)

1999. Эффект гидролизата из мидий при алеутской болезни норок // Вопросы вирусологии. № 1. С. 32–35. (Совместно с В. А. Илюхой, Н. Н. Тютюнником, Х. И. Мелдо, А. Р. Унжаковым.)

Morphobiochemical blood indices in mink with chewed fur // Scientifur. Vol. 23, N 4. P. 261–265. (Совместно с V. A. Ilukha.)

2000. Рекомендации по использованию мидийного гидролизата в промышленном звероводстве. Петрозаводск, 18 с. (Совместно с Н. Н. Тютюнником, В. А. Илюхой, Х. И. Мелдо, Т. Г. Долгополовой, А. Р. Унжаковым.)

Мониторинг физиологического состояния пушных зверей в различные биологические периоды (Рекомендации). Петрозаводск, 25 с. (Совместно с Н. Н. Тютюнником, Л. К. Кожевниковой, В. А. Илюхой, А. Р. Унжаковым, Х. И. Мелдо, Т. Н. Ильиной, Л. Н. Сироткиной, В. М. Олейником, Е. Б. Свечкиной.)

2001. Морфобиохимические показатели и метаболизм лейкоцитов крови у норок-стригунов // С.-х. биология. № 4. С. 78–82. (Совместно с В. А. Илюхой.)

2002. Changes in the leucocyte alkaline phosphatase during the breeding period in mink // Scientifur. Vol. 25, N 3. P. 79–82. (Совместно с V. A. Ilukha.)

Обмен веществ и физиолого-биохимический статус норок под влиянием генно-инженерного соматотропного гормона // С.-х. биология. № 4. С. 66–73. (Совместно с Л. К. Эрнстом, Н. Н. Тютюнником, Л. Ф. Адигамовым, Л. Н. Сироткиной, В. А. Илюхой, А. Р. Унжаковым, Т. Н. Ильиной, Г. М. Малининой, В. М. Олейником, Е. Б. Свечкиной.)

Янтарная кислота как стимулятор // Кролиководство и звероводство. № 4. С. 7–8. (Совместно с Н. Н. Тютюнником, Л. К. Кожевниковой, М. Н. Бадовской, М. Н. Кондрашовой, Х. И. Мелдо, В. А. Илюхой, А. Р. Унжаковым.)

2003. Антиоксидантная система в физиологических адаптациях млекопитающих // Наземные и водные экосистемы Северной Европы: управление и охрана: материалы международной конференции, посвященной 50-летию Института биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск. С. 61–65. (Совместно с Т. Н. Ильиной, В. А. Илюхой, В. В. Белкиным, А. В. Ворошиловой, О. С. Скотти, С. А. Фроловой, А. В. Якимовым.)

Физиолого-биохимический статус организма норки и песцов и пути его оптимизации // Наземные и водные экосистемы Северной Европы: управление и охрана: материалы международной конференции, посвященной 50-летию Института биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск. С. 159–169. (Совместно с Н. Н. Тютюнником, Л. К. Кожевниковой, В. А. Илюхой, Т. Н. Ильиной, Г. Г. Петровой, Л. Н. Сироткиной, Г. М. Малининой, А. Р. Унжаковым, Н. Л. Рендаковым, В. М. Олейником, Е. Б. Свечкиной.)

2004. Влияние голодания на активность антиоксидантных ферментов у песцов // С.-х. биология. № 4. С. 47–51. (Совместно с В. А. Илюхой, Б. М. Дамгаард.)

Некоторые адаптивные реакции полуводных млекопитающих // Проблемы экологической физиологии пушных зверей. Вып. 3. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. С. 27–38. (Совместно с В. А. Илюхой, В. В. Белкиным,

А. В. Якимовым, О. С. Скотти, С. А. Фроловой, Н. В. Фелоровым.)

Особенности морфологии лейкоцитов крови у норки сапфирового окраса // Проблемы экологической физиологии пушных зверей. Вып. 3. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. С. 46–55. (Совместно с В. А. Илюхой, Н. Н. Тютюнником, А. Г. Голубевой.)

Морфо-цитохимические исследования лейкоцитов крови пушных зверей: методические рекомендации. Петрозаводск, 20 с. (Совместно с В. А. Илюхой, Н. Н. Тютюнником, А. Г. Голубевой.)

2005. Возрастные особенности лейкоцитарной формулы и морфометрических параметров лимфоцитов крови крыс при различных световых режимах // Медицинский академический журнал. 5, № 3, прил. 7. С. 36–38. (Совместно с В. А. Илюхой, И. А. Виноградовой, А. Г. Голубевой, С. А. Коросовым, А. В. Чуровым.)

Cytochemical investigation of sapphire mink blood leucocytes // Scientifur. Vol. 29, N 3–4. P. 126. (Совместно с А. Г. Golubeva, V. A. Ilukha, N. N. Tyutyunnik.)

2006. Влияние мелатонина и эпителина на антиоксидантную систему крыс зависит от светового режима // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. № 3. С. 22–26. (Совместно с Т. Н. Ильиной, В. А. Илюхой, И. А. Виноградовой, А. С. Федоровой.)

2007. Особенности структуры лейкоцитов крови норки различных генотипов // Вестник ВОГиС. Т. 11, № 1. С. 155–161. (Совместно с Н. Н. Тютюнником, А. Г. Голубевой, В. А. Илюхой.)

Morphometric and cytochemical investigation of subcellular structure on sapphire mink leucocytes // Scientifur. Vol. 31, N 2. P. 49–53. (Совместно с N. N. Tyutyunnik, A. G. Golubeva, V. A. Ilukha, M. G. Nyurpieva.)

Морфо-функциональные особенности лейкоцитов млекопитающих, разводимых в неволе в условиях Европейского Севера // Труды Карельского научного центра РАН. Вып. 11. С. 109–117. (Совместно с Н. Н. Тютюнником, А. Г. Голубевой, В. А. Илюхой, С. А. Коросовым.)

2008. Влияние мелатонина и эпителина на состав лейкоцитарной формулы и активность щелочной фосфатазы лейкоцитов крови крыс при различных режимах освещения в онтогенезе // Успехи геронтол. Т. 21. Вып. 3. С. 394–401. (Совместно с И. А. Виноградовой, А. Г. Голубевой, М. Г. Нюппиевой, В. А. Илюхой.)

2009. Влияние мутаций, затрагивающих окраску меха, на цитохимические особенности лейкоцитов крови у американской норки

(*Mustela vison* Schreber, 1777) // Информационный вестник ВОГИС. Т. 13, № 3. С. 571–578. (Совместно с А. Г. Голубевой, В. А. Илюхой, Н. Н. Тютюнником.)

Мутантные норки как модель в биомедицинских исследованиях // Труды Карельского научного центра РАН. № 3. С. 52–61. (Совместно с Н. Н. Тютюнником, А. Г. Голубевой, В. А. Илюхой.)

2010. Дефект лейкоцитов у разводимых в неволе пушных зверей // Кролиководство и звероводство. № 4. С. 25–27. (Совместно с А. Г. Голубевой, Н. Н. Тютюнником, В. А. Илюхой.)

Влияние витамина С на морфофункциональные и цитозензиматические показатели крови у норок с функциональным дефектом // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. № 4. С. 216–219. (Совместно с А. Г. Кижиной, Н. Н. Тютюнником, Е. Э. Антюковой, В. В. Илюхой.)

Адаптационные изменения метаболизма у животных различного экогенеза // Проблемы биологии продуктивных животных. № 4. С. 5–22. (Совместно с Н. Н. Тютюнником, В. А. Илюхой, Т. Н. Ильиной, А. Р. Унжаковым, Н. Л. Рендаковым, И. В. Баишниковой, А. Г. Кижиной, Е. Б. Свечкиной, С. Н. Сергиной.)

Оценка физиологического статуса млекопитающих как составляющая экологического мониторинга на Европейском Севере России // Вестник охотоведения. Т. 7, № 2. С. 354–357. (Совместно с Т. Н. Ильиной, С. А. Коросовым, А. Р. Унжаковым, П. И. Даниловым, В. В. Белкиным, А. Е. Якимовой, Т. Н. Ильиной, В. А. Илюхой.)

2011. Морфологические и цитохимические аспекты дефекта лейкоцитов в domestikируемых популяциях пушных зверей // Труды КарНЦ РАН. № 3. С. 62–68. (Совместно с А. Г. Кижиной, В. А. Илюхой, Н. Н. Тютюнником, О. В. Трапезовым, Н. Н. Шумиловой, Е. Е. Лариной.)

Влияние аскорбиновой кислоты на антиоксидантную систему и лейкоциты крови при врожденной патологии у норок // Ветеринария. № 8. С. 53–57. (Совместно с Т. Н. Ильиной, В. А. Илюхой, И. В. Баишниковой, С. Н. Сергиной, А. Г. Кижиной.)

Влияние мутаций, затрагивающих окраску меха, на структуру лейкоцитов крови у амери-

канской норки (*Mustela vison* Schreber, 1777) // Генетика. Т. 47, № 1. С. 87–94. (Совместно с О. В. Трапезовым, А. Г. Кижиной, В. А. Илюхой, Л. И. Трапезовой, Н. Н. Тютюнником.)

Морфология и цитохимия аномальных цитоплазматических гранул в лейкоцитах крови у норок сапфирового окраса // Морфология. Т. 140, № 6. С. 60 – 64. (Совместно с Н. Н. Тютюнником, А. Г. Кижиной, В. А. Илюхой.)

2012. Влияние мелатонина на соотношение нейтрофилов и лимфоцитов в крови млекопитающих зависит от возраста животных // Успехи геронтологии. Т. 25, № 3. С. 409–414. (Совместно с И. А. Виноградовой, А. Г. Кижиной, О. А. Прокopenko, А. И. Малкиелем, А. И. Горанским, С. Лапински, В. А. Илюхой.)

Влияние освещения в пренатальный и постнатальный периоды на некоторые физиологические показатели самцов крыс // Российский физиологический журнал. Т. 98, № 6. С. 714–723. (Совместно с Т. Н. Ильиной, И. А. Виноградовой, Е. А. Хижкиным, В. А. Илюхой, А. Р. Унжаковым, И. В. Баишниковой, А. Г. Кижиной, В. Н. Анисимовым.)

Влияние постоянного и естественного освещения на физиологическое состояние крыс // Принципы экологии. Научный электронный журнал. Вып. 1, № 1. С. 27–38. (Совместно с В. А. Илюхой, И. А. Виноградовой, Е. А. Хижкиным, Т. Н. Ильиной, Т. А. Лотош, Д. Л. Айзиковым, А. Г. Кижиной, А. В. Морозовым, В. Н. Анисимовым.)

2013. Морфологические особенности лимфоцитов периферической крови песцов при введении витаминов А и Е в различных дозах // Морфология. № 3. С. 39–44. (Совместно с И. В. Баишниковой, А. Г. Кижиной, Т. Н. Ильиной, В. А. Илюхой, Н. Н. Тютюнником.)

Отсутствие фотопериодизма нарушает функционирование физиологических систем в постнатальном онтогенезе крыс // Труды Карельского научного центра РАН. № 3. С. 149–158. (Совместно с Е. А. Хижкиным, В. Д. Юнаш, И. А. Виноградовой, В. А. Илюхой, Т. Н. Ильиной, Ю. П. Барановой, А. В. Морозовым.)

РИММА УЛЬЯНОВНА ВЫСОЦКАЯ (к 70-летию со дня рождения)



2014 год – юбилейный для заслуженного деятеля науки Республики Карелия, главного научного сотрудника лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН, доктора биологических наук, профессора Риммы Ульяновны Высоцкой.

Римма Ульяновна родилась 29 августа 1944 года в Глубокском районе Витебской области, в Белоруссии. После окончания Сегежской средней школы № 1, где у нее сформировался интерес к химии и, в частности, к химическим основам жизни, она поступила на отделение биологии и химии естественно-географического факультета Карельского государственного педагогического института (КГПИ, затем КГПУ, КГПА), которое с отличием окончила в 1968 году. В студенческие годы проявились ее упорство и самостоятельность, глубокая увлеченность изучаемыми областями науки, интерес к исследовательской работе. Первый опыт научного исследования она приобрела на 3-м курсе, во вре-

мя выполнения работы, посвященной изучению ферментативной активности лишайников. После окончания КГПИ была рекомендована в аспирантуру Института биологии Карельского филиала АН СССР по специальности «Биологическая химия». В 1973 году Р. У. Высоцкая защитила кандидатскую диссертацию на тему «Углеводный, липидный и аминокислотный состав некоторых гельминтов рыб», а в 1999 году – докторскую диссертацию на тему «Лизосомальные ферменты у рыб и влияние на них природных, антропогенных и патогенных факторов».

С 1971 года и по настоящее время Р. У. Высоцкая работает в лаборатории биохимии ИБ Карельского филиала АН СССР (лаб. экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН), прошла все научные должности вплоть до главного научного сотрудника. Основные направления ее исследований связаны с изучением углеводов, липидов, аминокислот, лизосомальных и других ферментов у животных в сравнительно-эволюционном и эколого-токсикологическом аспектах. Объекты исследований – рыбы, их гельминты, водные беспозвоночные, насекомые, млекопитающие. Большая часть ее работ посвящена изучению механизмов биохимической адаптации животных на тканевом и субклеточном уровне. Основное внимание в них уделяется роли лизосом и их ферментов в реакциях клеточной защиты при воздействии на организм неблагоприятных факторов, токсикантов, при развитии патологий; разработке методов для системы эколого-биохимического мониторинга.

Р. У. Высоцкая – высококвалифицированный специалист, она активна, компетентна и самостоятельна во всех аспектах научной деятельности: от этапа планирования объемов и выбора методов работ до реализации всех исследований и формулировки результатов. Она обладает всеми необходимыми качествами для научного руководства группами исследователей. Ее главные черты – глубокая заинтересованность в работе, последовательность в достижении цели, организованность и само-

дисциплина, аккуратность, высокая работоспособность. Римма Ульяновна отличается широкой эрудицией в области биохимии и в смежных науках, она общительна и всегда открыта для дискуссий с коллегами на различные темы.

С 2001 года Р. У. Высоцкая работает по совместительству на должности профессора кафедры химии КГПУ (КГПА), где ведет несколько курсов: биологическая химия, биохимия с основами молекулярной биологии, биохимия и основы биорегуляции организмов, спецкурс – экологическая биохимия. Обладая большим педагогическим опытом, она уделяет большое внимание обучению студентов, магистрантов, аспирантов новым современным методам исследований, обработке и обобщению полученной информации, проявляет заботу о каждом способном исследователе, стремится увлечь студентов актуальными научными проблемами и помогать молодым ученым. Она является членом государственной аттестационной комиссии КГПУ по химии, была также председателем итоговой аттестационной комиссии магистров и бакалавров эколого-биологического факультета ПетрГУ. Под руководством Р. У. Высоцкой подготовлены и защищены десятки дипломных и курсовых работ студентами КГПУ и ПетрГУ, шесть кандидатских диссертаций.

Она участвует в работе двух диссертационных советов: является членом совета по защите докторских и кандидатских диссертаций по биологическим специальностям (Д 212.190.01) при ПетрГУ и зам. председателя диссертационного совета по защите диссертаций по биохимии и физиологии (ДМ 212.087.01) при КГПУ (КГПА), выполняет обязанности председателя (заместителя председателя) экспертной комиссии ИБ КарНЦ РАН, является членом Ученых советов ИБ КарНЦ РАН и Института водных проблем Севера КарНЦ РАН.

Р. У. Высоцкая принимала участие в работе десятков международных, всероссийских и межрегиональных научных конференций. Она являлась ответственным исполнителем государственной тематики лаборатории экологической биохимии, исполнителем по всем грантам Президента РФ «Ведущие научные школы» с 2003 по 2014 годы, программ фундаментальных исследований Президиума РАН и ОБН РАН – таких, как «Биоресурсы», «Эколого-биохимические основы повышения продуктивности видов рыб, используемых в озерном рыбоводстве Карелии», «Комплексное исследование мидиевых сообществ как биоресурсов Белого моря», «Биохимическая характеристика молоди лосося, различающейся выбором местообитания после выклева», «Сравнительный анализ струк-

туры и функции лизосом у представителей различных таксонов эукариот», участвовала в выполнении программ ФЦП и в работах по грантам РФФИ, по договорам о сотрудничестве с другими институтами, а также с лабораториями ИБ КарНЦ РАН.

Р. У. Высоцкая – автор и соавтор более 320 научных работ. Это три монографии, шесть учебных пособий, статьи в журналах «Вопросы ихтиологии», «Паразитология», «Известия РАН», «Экология», «Прикладная биохимия и микробиология» и др., а также статьи в зарубежных изданиях. Она является научным редактором ряда сборников статей, материалов научных конференций, монографий, активно сотрудничает со многими коллегами из разных научных организаций страны.

В 1974 году Р. У. Высоцкая стала лауреатом премии комсомола Карелии в области науки. С тех пор за плодотворную научную и педагогическую работу Р. У. Высоцкая была награждена неоднократно: грамотами Президиума РАН, Президиума КарНЦ РАН, Карельского и Всесоюзного общества охраны природы, общества «Знание», памятными медалями общества охраны природы, медалью «Ветеран труда». Ей присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки Республики Карелия» и ученое звание профессора.

От всей души поздравляем Римму Ульяновну и желаем ей здоровья, благополучия, счастья, оптимизма, неизменных творческих успехов и реализации задуманных планов, свежих идей, верных друзей и благодарных учеников!

А. Л. Рабинович

СПИСОК ОСНОВНЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ Р. У. ВЫСОЦКОЙ

1973. О содержании липидов у некоторых гельминтов пресноводных рыб // Паразитология. Т. 7, № 1. С. 51–57. (Совместно с В. С. Сидоровым.)

1978. Определение малолетучих эфиров 2,4Д в почве // Химия в сельском хозяйстве. Т. XVI, № 10 (180). С. 46–47. (Совместно с А. А. Стрелковой, Е. И. Лизенко, В. С. Сидоровым.)

1979. Влияние абиетиновой кислоты на изолированные лизосомы рыб // Экспериментальные исследования влияния загрязнителей на водные организмы. Апатиты. С. 122–127. (Совместно с Т. Р. Руоколайнен, М. Ю. Крупновой.)

1980. Активность лизосомальных ферментов у взрослых самок озерного лосося *Salmo salar* L. в период преднерестового созревания // Вопросы ихтиологии. Т. 20, вып. 4 (123). С. 713–718. (Совместно с В. С. Сидоровым, Ю. В. Костылевым.)

1981. Участие лизосомального аппарата в ответной реакции организма на воздействие антропогенных факторов внешней среды // Сравнительные аспекты биохимии рыб и некоторых других животных. Петрозаводск. С. 5–18. (Совместно с В. С. Сидоровым.)

1983. Влияние смоляных кислот на молекулярную гетерогенность кислой фосфатазы печени форели // Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград. С. 60–64. (Совместно с Т. Р. Руоколайнен, В. С. Сидоровым.)

Участие лизосомальных ферментов в температурной адаптации карпов // Материалы по сравнительной физиологии и адаптации животных к абиогенным факторам внешней среды. Ярославль: ЯрГУ. С. 30–34. (Совместно с М. Ю. Крупновой, Т. Р. Руоколайнен.)

1984. Сравнительно-эволюционные исследования лизосом // 16-я конф. ФЕБО. М. С. 245. (Совместно с Т. Р. Руоколайнен.)

Ферменты лизосом в раннем развитии сига: влияние ионов цинка // Реакция гидробионтов на абиотические воздействия. Ярославль: ЯрГУ. С. 54–60. (Совместно с М. Ю. Крупновой, И. П. Мигаловским.)

1985. Изменение ферментного профиля лизосом у форели при голодании // Украинский биохим. журн. Т. 57, № 3. С. 62–65. (Совместно с М. Ю. Крупновой, Т. Р. Руоколайнен.)

О возможной роли лизосомального аппарата в механизмах реакции рыб на поверхностно-активные вещества // Экспериментальная водная токсикология. Рига: Зинатне. Вып. 10. С. 103–109. (Совместно с Т. Р. Руоколайнен, Н. Н. Немовой, М. Ю. Крупновой, П. О. Рипатти, В. С. Сидоровым.)

1986. Методические указания по диагностике физиологического состояния личинок и сеголеток карпа. М. 34 с. (Совместно с А. А. Яржомбеком, В. В. Лиманским, Т. В. Щербина, В. П. Лысенко, Е. Н. Бекиной, В. С. Сидоровым, П. О. Рипатти, Р. А. Поповой, Е. И. Лизенко, Н. Н. Немовой.)

1987. Исследование активности ферментов лизосом у форели при воздействии смоляных кислот // Гидробиол. журн. Т. 23, № 4. С. 82 (Совместно с Т. Р. Руоколайнен, В. С. Сидоровым.)

Биохимическая адаптация к температуре у разных видов рыб // Физиология и биохимия гидробионтов. Ярославль: ЯрГУ. С. 6–12. (Совместно с Т. Р. Руоколайнен.)

1988. Воздействие детергентов на структуру и функционирование лизосом у пресноводных рыб // Физиология и токсикология гидробионтов. Ярославль: ЯрГУ. С. 100–106. (Совместно с П. О. Рипатти.)

Природоохранные аспекты экологической биохимии рыб // Природные ресурсы Карелии, их использование и охрана. Петрозаводск. С. 132–144. (Совместно с В. С. Сидоровым.)

Биохимическая характеристика эритроцитов молоди атлантического лосося *Salmo salar* при некрозе плавников // Вопросы ихтиологии. Т. 28, № 6. С. 1042–1045. (Совместно с А. В. Третьяковым, А. И. Груздевым, Ю. А. Шустовым, Ю. А. Смирновым, В. С. Сидоровым.)

1989. Сравнительная биохимия гельминтов рыб: Аминокислоты, белки, липиды. Л.: Наука. (Совместно с В. С. Сидоровым, Л. П. Смирновым, С. Д. Гурьяновой.)

Влияние токсикантов различной химической природы на личинок радужной форели // Физиологические аспекты токсикологии гидробионтов. Ярославль: ЯрГУ. С. 88–96. (Совместно с Р. П. Ивановой, Т. А. Ломаевой, Э. С. Зубкович.)

1994. Изменение активности лизосомальных ферментов печени рыб при действии экологических факторов // Известия РАН. Сер. биол. № 4. С. 611–616. (Совместно с М. В. Лызловой, Ю. Г. Юровицким, В. С. Сидоровым.)

1995. Лизосомальные ферменты в ходе жизненного цикла слепней рода *Hybomitra* // Паразитология. Т. 29, № 5. С. 83–89. (Совместно с В. В. Сорокиной, В. С. Сидоровым.)

1998. Лизосомальные и некоторые другие ферменты в тканях леща *Abramis brama* в период зимовки // Вопросы ихтиологии. Т. 38, № 2. С. 267–272. (Совместно с О. П. Стерлиговой, В. С. Сидоровым.)

2000. Влияние различных солей калия на активность ферментов развивающейся икры радужной форели // Гидробиол. журн. Т. 36, № 6. С. 82–91. (Совместно с Н. В. Кайминой, В. С. Сидоровым.)

2001. Изучение активности гидролитических ферментов в раннем онтогенезе лососевидных в норме и при интоксикации метилизобутилкарбинолом // Проблемы рыболовства. № 1. С. 54–57. (Совместно с Н. Н. Немовой, И. Н. Заличевой.)

Ферментные системы лизосом у рыб при голодании // Экологические проблемы онтогенеза рыб. Физиолого-биохимические аспекты. М.: Изд-во МГУ. С. 178–187. (Совместно с Т. Р. Руоколайнен, М. Ю. Крупновой.)

2002. Использование биохимических методов при определении ПДК промышленных токсикантов // Прикладная биохимия и микробиология. Т. 38, № 3. С. 354–350. (Совместно с В. С. Сидоровым, Н. Н. Немовой, Ю. А. Фекловым.)

Integral biochemical index as a tool for the estimation of fish response to environmental pollution in the North aquatic ecosystems // Environmental Pollution of the Arctic. Rovaniemi, Finland. P. X17. (Совместно с N. N. Nemova, V. S. Sidorov.)

Эколого-биохимическое тестирование водоемов по состоянию рыб // Научные аспекты экологических проблем России. Сб. трудов под ред. Ю. А. Израэля. Т. 1. М.: Наука. С. 215–220. (Совместно с Н. Н. Немовой, В. С. Сидоровым.)

2003. Вариабельность интегрального биохимического индекса у рыб под влиянием техногенных вод горно-обогатительного комбината // Экология. № 4. С. 280–285. (Совместно с В. С. Сидоровым, Н. Н. Немовой, С. А. Такшеевым.)

Сравнительно-биохимические исследования в системе *Schistocephalus solidus* (Cestoda) – колюшка трехглая *Gasterosteus aculeatus* L. // Паразитология. Т. 37, № 6. С. 503–511. (Совместно с Е. П. Иешко, Н. В. Евсеевой.)

Влияние экологических условий на активность гидрологических ферментов наваги и трески Белого моря // Современные проблемы физиологии и экологии морских животных. Апатиты: Изд-во КНЦ РАН. С. 299–305. (Совместно с М. Ю. Крупновой, Е. И. Кяйвяряйнен, Н. Н. Немовой, Д. Н. Морозовым, С. А. Такшеевым.)

2004. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука. (Совместно с Н. Н. Немовой.)

Биохимическая индикация токсических воздействий на рыб // Актуальные проблемы водной токсикологии / Под ред. д. б. н., проф. Б. А. Флерова. Борок: ИБВВ РАН. С. 81–98. (Совместно с Н. Н. Немовой.)

The effect of Selenium and Tellurium on lysosomal enzymes activity in salmonid specimens // Macro Elements. Mengen- und Spurenelemente. Jena: Friedrich-Schiller-Universität. P. 439–442. (Совместно с N. Nemova, L. Bondareva.)

2006. Контрольные работы по курсу биологической химии: Пособие для студентов педагогических университетов по специальностям химия и биология. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 86 с. (Совместно с И. В. Суховской.)

2007. Активность цитохрома P-450 у сига *Coregonus lavaretus* и щуки *Esox lucius* из водоемов Субарктики при воздействии сточных вод горно-перерабатывающих предприятий // Вопросы ихтиологии. Т. 47, № 1. С. 101–106. (Совместно с Д. Н. Морозовым, Н. Н. Немовой, Н. А. Кашулиным.)

Сравнительное изучение желчно-кислотного состава желчи европейской ряпушки *Coregonus albula* и сига *Coregonus lavaretus* в условиях техногенного загрязнения водоема // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. Т. 43, № 5. С. 410–413. (Совместно с Д. Н. Морозовым.)

Сезонные изменения жирнокислотного состава у литоральных гаммарид (*Amphipoda: Gammaridae*) // Современные проблемы науки и образования. 2007. № 5. С. 18–24. (Совместно с Н. П. Ткач, В. Ф. Брызгиным.)

Сравнительное изучение липидного состава амфипод, обитающих в условиях различной солености // Фундаментальные исследования. № 10. С. 89–90. (Совместно с Н. П. Ткач.)

Влияние солености среды обитания на жирнокислотный состав общих липидов амфипод Белого моря // Известия Самарского центра Российской академии наук. Т. 1. С. 98–102. (Совместно с Н. П. Ткач, В. Ф. Брызгиным.)

Влияние нефтяного загрязнения на липидный состав амфипод // Фундаментальные исследования. № 12. С. 143–145. (Совместно с Н. П. Ткач.)

Лабораторные работы по биологической химии: учебно-методическое пособие. Петрозаводск: Изд-во КГПУ. 124 с. (Совместно с А. А. Егоровой.)

2008. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. М.: Наука. 284 с. (Совместно с Н. Н. Немовой.)

2009. Difference of biochemical responses of subtidal and intertidal mussels to anoxia and salinity stress // Arctic frontiers. The age of the Arctic. Norway, Trømсе. 2009. P. 107. (Совместно с V. S. Amelina.)

2010. Влияние гельминтной инвазии на липидный обмен бокоплавов Белого моря // Паразитология. Т. 44, вып. 2. С. 128–134. (Совместно с Н. П. Ткач, Е. С. Керц.)

Searching of the biologically active substances that mediate intra- and interspecific competition between epibentic organisms. Investigation on the example of the White Sea fouling communities // Current problems of physiology and biochemistry of aquatic organisms. Vol. II. Arctic and Sub-Arctic biological resources – potential for biotechnology // Collected scientific papers of the first international seminar and PhD Workshop. Petrozavodsk, KRC RAS. P. 32–33. (Совместно с V. V. Khalaman, V. S. Skidchenko, M. A. Daugavet.)

Saltwater mussels (Family Mytilidae) – prospective source of high-active hydrolytic enzymes // Current problems of physiology and biochemistry of aquatic organisms. Vol. II. Arctic and Sub-Arctic biological resources – potential for biotechnology // Collected scientific papers of the first international seminar and PhD Workshop. Petrozavodsk, KRC RAS. P. 100–101. (Совместно с V. S. Skidchenko.)

2011. Биологический синтез белка: учебное пособие. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 22 с. (Совместно с А. А. Егоровой.)

Воздействие экскреторно-секреторных продуктов некоторых беломорских организмов-обрастателей на биохимические показатели мидии съедобной *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia) // Известия РАН. Сер. биол. № 6. С. 670–683. (Совместно с В. С. Скидченко, М. Ю. Крупновой, В. В. Халаманом.)

2012. Биохимические аспекты паразито-хозяйственных отношений в условиях трансформированных водоемов, на примере паразитов щуки цестод рода *Triaenophorus* // Биота северных озер в условиях антропогенного воздействия. Петрозаводск: КарНЦ РАН. С. 88–94. (Совместно с М. Ю. Крупновой.)

Активность лизосомальных ферментов в органах рыб // Биота северных озер в условиях антропогенного воздействия. Петрозаводск: КарНЦ РАН. С. 143–150. (Совместно с С. А. Такшеевым, Е. А. Вдовиченко.)

Спектр изоформ кислой дезоксирибонуклеазы в тканях мидий *Mytilus edulis* в условиях модельной интоксикации нефтепродуктами // Труды КарНЦ РАН. № 2. С. 131–138. (Совместно с В. С. Скидченко, Н. Н. Немовой.)

Витамины, их роль в процессах жизнедеятельности организмов: учебное пособие. Петрозаводск: КарНЦ РАН. 136 с. (Совместно с Д. Н. Морозовым.)

2013. Effect of heavy metals and temperature on the activity of some lysosomal enzymes of the White Sea mussels *M. edulis* // The FEBS Journal. Vol. 280, Supplement 1. P. 584. (Совместно с Е. Vdovichenko.)

Сравнительная характеристика активности лизосомальных гликозидаз у щук, обитающих в водоемах с разным уровнем антропогенной нагрузки // Фундаментальные исследования. № 4 (часть 5). С. 1134–1138. (Совместно с Е. А. Вдовиченко.)

РЕЦЕНЗИИ И БИБЛИОГРАФИЯ

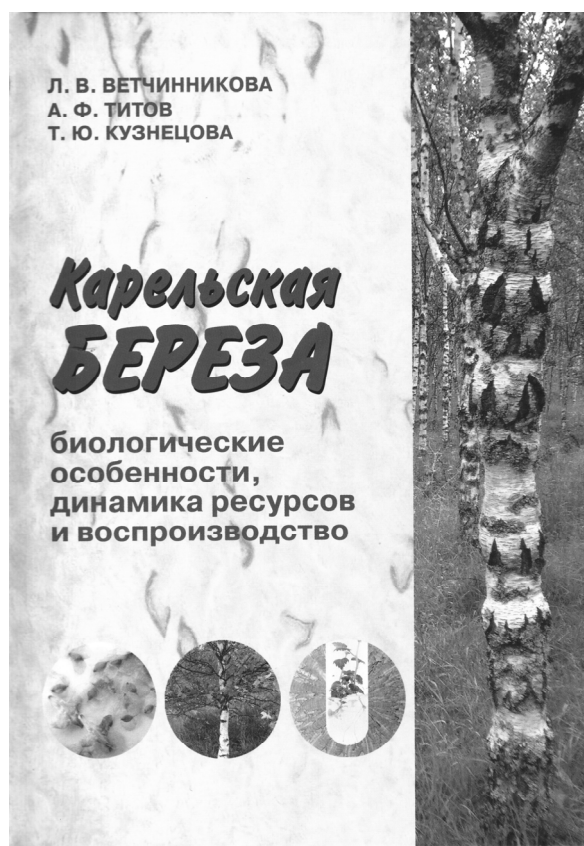


Биота северных озер в условиях антропогенного воздействия / Кол. монография под ред. Н. Н. Немовой, Н. В. Ильмаста, Е. П. Иешко, О. В. Мещеряковой. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2012. 230 с.

В монографии обобщены результаты комплексных исследований последствий антропогенной трансформации оз. Костомукшское (Костомукшского хвостохранилища) и озер системы Кенти–Кенто, подверженных влиянию сбрасываемых техногенных вод горно-обогатительного комбината ОАО «Карельский окатыш». Авторским коллективом показаны закономерности изменения биоразнообра-

зия, популяционной структуры и продуктивности рыбного населения и их массовых паразитов, характеризующие особенности антропогенного загрязнения исследованных водных экосистем. На основании данных ихтиологических, паразитологических и биохимических исследований дается оценка особенностей адаптационных механизмов гидробионтов в зависимости от уровня их организации в ряду «организм-популяция-биоценоз». Обсуждаются общие закономерности приспособительных и предпатологических процессов, развивающихся у исследуемых гидробионтов при разной степени антропогенного загрязнения водных сообществ. Описываются тканеспецифичные особенности метаболических процессов, определяющих основные клеточные функции в условиях негативного воздействия на организм, а также половые, возрастные и видовые различия приспособительных реакций у рыб. Предложена комплексная система методов и принципов оценки состояния и мониторинга динамики рыбного «населения» северных озерно-речных систем в условиях антропогенной трансформации, включающая гидробиологические, ихтиологические, паразитологические, биохимические, гистологические и токсикологические методы исследований. Эту систему можно рекомендовать к использованию в качестве инструмента биоиндикации состояния водоемов в системе общих мер охраны и рационального использования рыбных ресурсов водоемов Северо-Запада России.

Монография может быть рекомендована широкому кругу исследователей и специалистов, а также для разработки образовательных программ высшего профессионального образования по направлениям подготовки бакалавриата, магистрата и аспирантуры.



УДК 582.632.1: 581.16: 502.171

Ветчинникова Л. В., Титов А. Ф., Кузнецова Т. Ю.

Карельская береза: биологические особенности, динамика ресурсов и воспроизводство. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2013. 312 с.: ил. 130, табл. 30. Библиогр. 470 назв.

ISBN 978-5-9274-0608-1

В монографии обобщены результаты многолетних исследований карельской березы *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, обладающей высокоценной узорчатой древесиной, генофонд которой в природных условиях к настоящему времени в значительной степени утрачен. На основании собственных и литературных данных описаны ос-

новные биологические особенности карельской березы, показаны современные границы ее ареала, выявлены основные причины их изменения, наблюдаемые на протяжении последних почти 100 лет. Особое внимание уделено вопросам динамики ресурсов карельской березы в условиях изменения природно-климатической среды и антропогенных воздействий. Представлены данные о репродуктивном потенциале карельской березы и рассмотрены возможности использования современных биотехнологий для воспроизводства ее ресурсов и сохранения генетического разнообразия. Также рассмотрены вопросы происхождения карельской березы и механизмы формирования у нее узорчатой текстуры древесины.

Для научных работников, преподавателей вузов, аспирантов и студентов лесохозяйственных и биологических специальностей, а также для исследователей и специалистов в области охраны и воспроизводства растительных ресурсов.

© Ветчинникова (Конина) Л. В., Титов А. Ф., Кузнецова Т. Ю., 2013

© Карельский научный центр РАН, 2013

© Институт леса Карельского научного центра РАН, 2013

© Институт биологии Карельского научного центра РАН, 2013

Ответственный редактор: член-корреспондент РАН А. Ф. Титов

Рецензенты: доктор биологических наук А. М. Крышень, кандидат биологических наук О. Н. Лебедева

Подготовка и издание монографии осуществлялись при финансовой поддержке Программы Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий».

УТРАТЫ

СТАНИСЛАВ НИКОЛАЕВИЧ ДРОЗДОВ (1930–2014 гг.)



29 марта 2014 г. ушел из жизни известный ученый – физиолог растений, эколог, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки Республики Карелия и Российской Федерации Станислав Николаевич Дроздов.

С. Н. Дроздов родился в 1930 г. в Ставрополе Кавказском в семье ученого биолога-растениевода. В 1954 г. окончил с красным дипломом Ленинградский сельскохозяйственный институт (ЛСХИ) по специальности «ученый-агроном». Еще студентом он проявил склонность к научной работе, и по окончании института его направили на учебу в аспирантуру ЛСХИ, которую он проходил под руководством профессора В. А. Новикова. В 1957 г. молодой ученый успешно защитил кандидатскую диссертацию и некоторое время работал на кафедре агрохимии ЛСХИ. В 1958 г. С. Н. Дроздов переехал в Петрозаводск и приступил к работе в лаборатории экологической физиологии растений Института биологии Карельского филиала АН СССР в должности младшего научного сотрудника.

Незаурядные научные и организаторские способности Станислава Николаевича были быстро замечены и оценены. Уже в 1960 г. он становится заведующим лабораторией, а в 1961 г. назначается директором Института биологии, который затем бессменно возглавляет на протяжении 35 лет.

Первоначально тематика научных работ руководимой им лабораторией была связана с изучением минерального питания растений (в 60-е годы в стране была принята программа химизации сельскохозяйственного производства, и данное направление считалось одним из приоритетных для физиологии растений), а затем сфокусировалась на вопросах устойчивости сельскохозяйственных культур (картофель, многолетние травы) к заморозкам. Это потребовало разработки методики проведения искусственных заморозков и создания на территории Агробиологической станции Института биологии специальной экспериментальной базы, включающей вегетационный домик и камеры с регулированием условий среды. В дальнейшем это позволило проводить разнообразные эксперименты, направленные на изучение влияния заморозков на разные стороны жизнедеятельности растений. По их результатам С. Н. Дроздов успешно защитил в 1971 г. докторскую диссертацию на тему «Эколого-физиологические исследования устойчивости полевых культур к заморозкам».

Следующим важным шагом в развитии исследований лаборатории стало изучение действия абиотических факторов среды (низкие и высокие температуры, световые условия) на терморезистентность и различные структурные и функциональные показатели клеток и тканей холодостойких и теплолюбивых

вых растений, а также изучение возможностей управления ростом, развитием, формированием продуктивности растений при неблагоприятных внешних условиях с помощью физиологически активных веществ.

В 70-е годы на основании результатов многолетних исследований С. Н. Дроздов совместно с коллегами по лаборатории выдвинул гипотезу «зонального» влияния температуры на устойчивость активно вегетирующих растений, которая была экспериментально подтверждена на многих видах и сортах. В 90-е годы научный интерес С. Н. Дроздова обращен к изучению эколого-физиологической характеристики растений, определению границ температурных зон и свето-температурных зависимостей CO_2 -газообмена у растений культурной и дикой флоры.

Авторитет возглавляемой Станиславом Николаевичем лаборатории экологической физиологии неоднократно подтверждался на всероссийском уровне. Так, в 1996 г. коллектив лаборатории официально признан ведущей научной школой по экологической физиологии растений в стране. Исследования по изучению эффективности CO_2 -обмена интактных растений в зависимости от условий среды отмечены в 1995 г. премией имени И. И. Гунара, а сами научные работы С. Н. Дроздова получили широкую известность в нашей стране и за рубежом. В целом за годы исследований им опубликовано более 450 научных работ, включая 3 монографии. Он соавтор около десятка авторских свидетельств на изобретение и более 20 практических рекомендаций сельскохозяйственного профиля. Трижды (1994–1997, 1997–2000 и 2000–2003 гг.) был удостоен Государственной научной стипендии для выдающихся ученых России.

На протяжении многих лет С. Н. Дроздов активно участвует в пропаганде научных знаний, уделяет большое внимание подготовке научных кадров. Под его руководством подготовлено и успешно защищено более двух десятков диссертаций.

Как директор Института биологии, С. Н. Дроздов считал основной задачей учреждения становление и развитие в Карелии разноплановых биологических исследований, а также создание и развитие в институте современной материально-технической и приборно-аналитической базы. Его широкий

научный кругозор, глубокое понимание задач, стоящих перед биологической наукой, определяющим образом сказались на формировании и выборе многих направлений исследований института. Появились и получили свое развитие такие новые перспективные научные направления, как экологическая биохимия и биофизика, экологическая физиология растений и животных, биология развития и изучение биоразнообразия, палеонтологические аспекты эволюции, исследование генезиса и структуры почв, биология развития, а также прикладные исследования, связанные с разработкой научных основ рационального использования природных биологических ресурсов и их охраной.

В разные годы Станислав Николаевич являлся членом многих научных советов, различных научных обществ. С 1961 по 1996 г. был членом Президиума КарНЦ РАН и членом бюро Отделения биологических наук АН СССР (а затем РАН), входил в состав нескольких диссертационных советов.

С. Н. Дроздова всегда отличала активная гражданская позиция, которую он полностью представлял, участвуя в общественной жизни города и республики. Он неоднократно избирался председателем общества «Знание» Карельского филиала АН СССР (1969–1972 гг.), председателем общества «Знание» г. Петрозаводска (1970–1982 гг.), членом горкома КПСС (1977–1982 гг.), депутатом городского Совета депутатов трудящихся (1977–1982 гг.), председателем Карельского отделения Общества физиологов растений (1988–2007 гг.), председателем Карельского отделения Всероссийского общества охраны природы (1988–1996 гг.), членом Верховного Совета Карельской АССР (1985–1990 гг.).

Его многолетняя и плодотворная работа получила высокую оценку со стороны государства. Он награжден орденами Дружбы народов и «Знак Почета», рядом медалей и многими грамотами. Ему присвоено звание «Заслуженный изобретатель СССР».

Добрую память о С. Н. Дроздове надолго сохраняют его коллеги по лаборатории, многочисленные ученики и последователи, сотрудники Института биологии и Карельского научного центра РАН.

А. Ф. Титов, Н. П. Будыкина, В. В. Таланова

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

(требования к работам, представляемым к публикации
в «Трудах Карельского научного центра Российской академии наук»)

«Труды Карельского научного центра Российской академии наук» (далее – Труды КарНЦ РАН) публикуют результаты завершённых оригинальных исследований в различных областях современной науки: теоретические и обзорные статьи, сообщения, материалы о научных мероприятиях (симпозиумах, конференциях и др.), персоналии (юбилеи и даты, потери науки), статьи по истории науки. Представляемые работы должны содержать новые, ранее не публиковавшиеся данные.

Статьи проходят обязательное рецензирование. Решение о публикации принимается редакционной коллегией серии или тематического выпуска Трудов КарНЦ РАН после рецензирования, с учётом научной значимости и актуальности представленных материалов. Редколлегия серий и отдельных выпусков Трудов КарНЦ РАН оставляет за собой право возвращать без регистрации рукописи, не отвечающие настоящим правилам.

При получении редакцией рукопись регистрируется (в случае выполнения авторами основных правил ее оформления) и направляется на отзыв рецензентам. Отзыв состоит из ответов на типовые вопросы «Анкеты» и может содержать дополнительные расширенные комментарии. Кроме того, рецензент может вносить замечания и правки в текст рукописи. Авторам высылаются электронная версия «Анкеты» и комментарии рецензентов. Доработанный экземпляр автор должен вернуть в редакцию вместе с первоначальным экземпляром и ответом на все вопросы рецензента не позднее чем через месяц после получения рецензии. Перед сдачей в печать авторам высылаются распечатанная версия статьи, которая вычитывается, подписывается авторами и возвращается в редакцию.

Почтовый адрес редакции: 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11, КарНЦ РАН, редакция Трудов КарНЦ РАН. Телефон: (8142) 762018.

Содержание номеров Трудов КарНЦ РАН, аннотации и полнотекстовые электронные варианты статей, а также другая полезная информация, включая настоящие Правила, доступна на сайте – <http://transactions.krc.karelia.ru>.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСИ

Статьи публикуются на русском или английском языке. Рукописи должны быть тщательно выверены и отредактированы авторами.

Объём рукописи (включая таблицы, список литературы, подписи к рисункам, рисунки) не должен превышать: для обзорных статей – 30 страниц, для оригинальных – 25, для сообщений – 15, для хроники и рецензий – 5–6. Объём рисунков не должен превышать 1/4 объёма статьи. Рукописи большого объёма (в исключительных случаях) принимаются при достаточном обосновании по согласованию с ответственным редактором.

При оформлении рукописи применяется полуторный межстрочный интервал, шрифт Times New Roman, кегль 12, выравнивание по обоим краям. Размер полей страницы – 2,5 см со всех сторон. Все страницы, включая список литературы и подписи к рисункам, должны иметь сплошную нумерацию в нижнем правом углу. Страницы с рисунками не нумеруются.

Рукописи подаются в электронном виде, в формате MS Word, желательно версии 2003, лично в редакцию или по e-mail: trudy@krc.karelia.ru. Также к подаваемой рукописи желательно прилагать два экземпляра, напечатанных на одной стороне листа формата А4 в одну колонку.

ОБЩИЙ ПОРЯДОК РАСПОЛОЖЕНИЯ ЧАСТЕЙ СТАТЬИ

Элементы статьи должны располагаться в следующем порядке: *УДК* курсивом на первой странице, в левом верхнем углу; заглавие статьи на русском языке заглавными буквами полужирным шрифтом; инициалы, фамилии всех авторов на русском языке полужирным шрифтом; полное название организации – место работы каждого автора в именительном падеже на русском языке курсивом (если авторов несколько и работают они в разных учреждениях, то следует отметить арабскими цифрами соответствие фамилий авторов учреждениям, в которых они работают; если все авторы статьи работают в одном учреждении, можно не указывать место работы каждого автора отдельно); аннотация на русском языке; ключевые слова на русском языке; инициалы, фамилии всех авторов на английском языке полужирным шрифтом; название статьи на английском языке заглавными буквами полужирным шрифтом; аннотация на английском языке; ключевые слова на английском языке; текст статьи (статьи экспериментального характера, как правило, должны иметь разделы: ВВЕДЕНИЕ. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. ВЫВОДЫ. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ); благодарности; список литературы (с новой страницы); таблицы (на отдельных листах); рисунки (на отдельных листах); подписи к рисункам (на отдельном листе).

На отдельном листе дополнительные сведения об авторах: фамилии, имена, отчества всех авторов полностью на русском и английском языке; полный почтовый адрес каждой организации (страна, город) на русском и английском языке; должности авторов; адрес электронной почты для каждого автора; телефон для контактов с авторами статьи (можно один на всех авторов).

ЗАГЛАВИЕ СТАТЬИ должно точно отражать содержание статьи и содержать не более 8–10 значащих слов.

АННОТАЦИЯ должна быть лишена вводных фраз, создавать возможно полное представление о содержании статьи и иметь объем 10–15 предложений. Рукопись с недостаточно раскрывающей содержание аннотацией может быть отклонена.

Отдельной строкой приводится перечень **КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ**. Ключевые слова или словосочетания отделяются друг от друга запятой, в конце фразы ставится точка. Слова, фигурирующие в заголовке статьи, ключевыми являться не могут.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ должны содержать сведения об объекте исследования с обязательным указанием латинских названий и сводок, по которым они приводятся, авторов классификаций и пр. Транскрипция географических названий должна соответствовать атласу последнего года издания. Единицы физических величин приводятся по Международной системе СИ. Желательна статистическая обработка всех количественных данных. Необходимо возможно точнее обозначать местонахождения (в идеале – с точным указанием географических координат).

ИЗЛОЖЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ должно заключаться не в пересказе содержания таблиц и графиков, а в выявлении следующих из них закономерностей. Автор должен сравнить полученную им информацию с имеющейся в литературе и показать, в чем заключается ее новизна. Следует ссылаться на табличный и иллюстративный материал так: на рисунки, фотографии и таблицы в тексте (рис. 1, рис. 2, табл. 1, табл. 2 и т.д.), фотографии, помещаемые на вклейках (рис. I, рис. II). Обсуждение завершается формулировкой основного вывода, которая должна содержать конкретный ответ на вопрос, поставленный во Введении. Ссылки на литературу в тексте даются фамилиями, например: Карху, 1990 (один автор); Раменская, Андреева, 1982 (два автора); Крутов и др., 2008 (три автора или более), и заключаются в квадратные скобки. При перечислении нескольких источников работы располагаются в хронологическом порядке, например: [Иванов, Топоров, 1965; Успенский, 1982; Erwin et al., 1989; Рыбаков, 1994; Longman, 2001].

ТАБЛИЦЫ нумеруются в порядке упоминания их в тексте, каждая таблица имеет свой заголовок. На полях рукописи (слева) карандашом указываются места расположения таблиц при первом упоминании их в тексте. Диаграммы и графики не должны дублировать таблицы. Материал таблиц должен быть понятен без дополнительного обращения к тексту. Все сокращения, использованные в таблице, должны быть пояснены в Примечании, расположенном под ней. При повторении цифр в столбцах нужно их повторять, при повторении слов – в столбцах ставить кавычки. Таблицы могут быть книжной или альбомной ориентации (при соблюдении вышеуказанных параметров страницы).

РИСУНКИ представляются отдельными файлами с расширением TIF (*.TIF) или JPG. При первичной подаче материала в редакцию рисунок вставляются в общий текстовый файл на отдельных страницах. При сдаче материала, принятого в печать, все рисунки из текста статьи должны быть убраны и представлены в виде отдельных файлов. Графические материалы должны быть снабжены распечатками с указанием желательного размера рисунка, пожеланий и требований к конкретным иллюстрациям. На каждый рисунок должна быть как минимум одна ссылка в тексте. Иллюстрации объектов, исследованных с помощью фотосъемки, микроскопа (оптического, электронного трансмиссионного и сканирующего), должны сопровождаться масштабными линейками, причем в подрисуночных подписях надо указать длину линейки. Приводить данные о кратности увеличения необязательно, поскольку при публикации рисунков размеры изменятся. Крупномасштабные карты желательно приводить с координатной сеткой, обозначениями населенных пунктов и/или названиями физико-географических объектов и разной фактурой для воды и суши. В углу карты желательна врезка с мелкомасштабной картой, где был бы указан участок, увеличенный в крупном масштабе в виде основной карты.

ПОДПИСИ К РИСУНКАМ должны содержать достаточно полную информацию, для того чтобы приводимые данные могли быть понятны без обращения к тексту (если эта информация уже не дана в другой иллюстрации). Аббревиации расшифровываются в подрисуночных подписях.

ЛАТИНСКИЕ НАЗВАНИЯ. В расширенных латинских названиях таксонов не ставится запятая между фамилией авторов и годом, чтобы была понятна разница между полным названием таксона и ссылкой на публикацию в списке литературы. Названия таксонов рода и вида печатаются курсивом. Вписывать латинские названия в текст от руки недопустимо. Для флористических, фаунистических и таксономических работ при первом упоминании в тексте и таблицах приводится русское название вида (если такое название имеется) и полностью — латинское, с автором и желательно с годом, например: водяной ослик (*Asellus aquaticus* (L. 1758)). В дальнейшем можно употреблять только русское название или сокращенное латинское без фамилии автора и года опубликования, например, для брюхоногого моллюска *Margarites groenlandicus* (Gmelin 1790) – *M. groenlandicus* или для подвида *M. g. umbilicalis*.

СОКРАЩЕНИЯ. Разрешаются лишь общепринятые сокращения – названия мер, физических, химических и математических величин и терминов и т. п. Все сокращения должны быть расшифрованы, за исключением небольшого числа общеупотребительных.

* Названия видов приводятся на латинском языке **КУРСИВОМ**, в скобках указываются высшие таксоны (семейства), к которым относятся объекты исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ. В этой рубрике выражается признательность частным лицам, сотрудникам учреждений и фондам, оказавшим содействие в проведении исследований и подготовке статьи, а также указываются источники финансирования работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. Пристатейные ссылки и/или списки пристатейной литературы следует оформлять по ГОСТ Р 7.0.5-2008. Библиографическая ссылка. Общие требования и правила составления (http://www.bookchamber.ru/GOST_P_7.0.5.-2008). Список работ представляется в алфавитном порядке. Все ссылки даются на языке оригинала (названия на японском, китайском и других языках, использующих нелатинский шрифт, пишутся в русской транскрипции). Сначала приводится список работ на русском языке и на языках с близким алфавитом (украинский, болгарский и др.), а затем – работы на языках с латинским алфавитом. В списке литературы между инициалами ставится пробел.

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ 1-Й СТРАНИЦЫ

УДК 631.53.027.32:635.63

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ПРЕДПОСЕВНОГО ЗАКАЛИВАНИЯ СЕМЯН НА ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА

Е. Г. Шерудило¹, М. И. Сысоева¹, Г. Н. Алексейчук², Е. Ф. Марковская¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра РАН

²Институт экспериментальной ботаники НАН Республики Беларусь им. В. Ф. Купревича

Аннотация на русском языке

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L.; кратковременное снижение температуры; устойчивость.

E. G. SHERUDILO, M. I. SYSOEVA, G. N. ALEKSEICHUK, E. F. MARKOVSKAYA. EFFECTS OF DIFFERENT REGIMES OF SEED HARDENING ON COLD RESISTANCE IN CUCUMBER PLANTS

Аннотация на английском языке

Key words: *Cucumis sativus* L.; temperature drop; resistance.

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ ТАБЛИЦЫ

Таблица 2. Частота встречаемости видов нематод в исследованных биотопах

Биотоп (площадка)	Кол-во видов	Встречаемость видов нематод в 5 повторностях				
		100 %	80 %	60 %	40 %	20 %
1Н	26	8	4	1	5	8
2Н	13	2	1	1	0	9
3Н	34	13	6	3	6	6
4Н	28	10	5	2	2	9
5Н	37	4	10	4	7	12

Примечание. Здесь и в табл. 3–4: биотоп 1Н – территория, заливаемая в сильные приливы; 2Н – постоянно заливаемый луг; 3Н – редко заливаемый луг; 4Н – незаливаемая территория; 5Н – периодически заливаемый луг.

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ ПОДПИСИ К РИСУНКУ

Рис. 1. Северный точильщик (*Hadrobregmus confuses* Kraaz.)

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ СПИСКА ЛИТЕРАТУРЫ

Ссылки на книги

Вольф Г. Н. Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм в органической химии / ред. Г. Снатке. М.: Мир, 1970. С. 348–350.

Илиел Э. Стереохимия соединений углерода / пер. с англ. М.: Мир, 1965. 210 с.

Несис К. Н. Океанические головоногие моллюски: распространение, жизненные формы, эволюция. М.: Наука, 1985. 285 с.

Knorre D. G., Laric O. L. Theory and practice in affinity techniques / Eds. P. V. Sundaram, F. L. Eckstein. N. Y., San Francisco: Acad. Press, 1978. P. 169–188.

Ссылки на статьи

Викторов Г. А. Межвидовая конкуренция и сосуществование экологических гомологов у паразитических перепончатокрылых // Журн. общ. биол. 1970. Т. 31, № 2. С. 247–255.

Grove D. J., Loisesides L., Nott J. Satiation amount, frequency of feeding and emptying rate in *Salmo gairdneri* // J. Fish. Biol. 1978. Vol. 12, N 4. P. 507–516.

Ссылки на материалы конференций

Марьинских Д. М. Разработка ландшафтного плана как необходимое условие устойчивого развития города (на примере Тюмени) // Экология ландшафта и планирование землепользования: тезисы докл. Всерос. конф. (Иркутск, 11–12 сент. 2000 г.). Новосибирск, 2000. С. 125–128.

Ссылки на авторефераты диссертаций

Шефтель Б. И. Экологические аспекты пространственно-временных межвидовых взаимоотношений землероек Средней Сибири: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1985. 23 с.

Ссылки на диссертации

Шефтель Б. И. Экологические аспекты пространственно-временных межвидовых взаимоотношений землероек Средней Сибири: дис. ... канд. биол. наук. М., 1985. С. 21–46.

Ссылки на патенты

Патент РФ № 2000130511/28, 04.12.2000.

Еськов Д. Н., Серегин А. Г. Оптико-электронный аппарат // Патент России № 2122745. 1998. Бюл. № 33.

Ссылки на архивные материалы

Гребенщиков Я. П. К небольшому курсу по библиографии : материалы и заметки, 26 февр. – 10 марта 1924 г. // ОР РНБ. Ф. 41. Ед. хр. 45. Л. 1–10.

Ссылки на интернет-ресурсы

Паринов С. И., Ляпунов В. М., Пузырев Р. Л. Система Соционет как платформа для разработки научных информационных ресурсов и онлайн-сервисов // Электрон. б-ки. 2003. Т. 6, вып. 1. URL: <http://www.elbib.ru/index.phtml?page=elbib/rus/journal/2003/part1/PLP/> (дата обращения: 25.11.2006).

Ссылки на электронные ресурсы на CD-ROM

Государственная Дума, 1999–2003 [Электронный ресурс]: электронная энциклопедия/Аппарат Гос. Думы Федер. Собрания Рос. Федерации. М., 2004. 1 CD-ROM.

TABLE OF CONTENTS

REVIEWS

I. V. Kurbatova, L. V. Topchieva, N. N. Nemova. CIRCADIAN GENES AND CARDIOVASCULAR PATHOLOGY	3
N. N. Nemova, O. V. Meshcheryakova, L. A. Lysenko, N. N. Fokina. THE ASSESSMENT OF THE FITNESS OF AQUATIC ORGANISMS RELYING ON THE BIOCHEMICAL STATUS	18
L. V. Topchieva, O. M. Fedorenko. METHODOLOGICAL APPROACHES TO STUDYING THE MOLECULAR MECHANISMS OF ADAPTATION IN POPULATIONS	30
N. N. Nemova, Z. A. Nefyodova, S. A. Murzina. LIPID PATTERNS EARLY IN ATLANTIC SALMON, <i>SALMO SALAR</i> L., ONTOGENY	44

ORIGINAL PAPERS

E. N. Ikkonen, T. G. Shibaeva, E. G. Sherudilo, <u>M. I. Sysoeva</u> . EFFECT OF SHORT- AND LONG-TERM LOW TEMPERATURE TREATMENTS ON PHOTOSYNTHETIC RATE AND STOMATAL CONDUCTANCE IN <i>CUCUMIS SATIVUS</i> L. LEAVES AT DIFFERENT GROWTH PHASES	53
T. S. Nikolaevskaya, O. M. Fedorenko. THE LEAF TRICHOME MORPHOLOGY FEATURES OF TWO <i>ARABIDOPSIS</i> PLANTS (<i>A. LYRATA</i> SSP. <i>PETRAEA</i> AND <i>A. THALIANA</i>) IN NORTHERN POPULATIONS	59
A. S. Goryunov, A. G. Borisova. PROBABLE MECHANISM OF HAEMOGLOBIN AUTOXIDATION IN WATER DISPERSIONS OF CARBON-BASED NANOMATERIALS	71
L. B. Uzenbaeva, I. V. Baishnikova, A. G. Kizhina, T. N. Ilyina, V. A. Ilyukha, N. N. Tyutyunnik . MORPHOMETRIC PARAMETERS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN SILVER (<i>VULPES VULPES</i> L.) AND BLUE (<i>ALOPEX LAGOPUS</i> L.) FOXES TREATED WITH VARIOUS DOSES OF VITAMINS A AND E	78
S. N. Pekkoeva, S. A. Murzina, Z. A. Nefyodova, T. R. Ruokolainen, P. O. Ripatti, N. N. Nemova. LIPID STATUS OF THE WHITE SEA HERRING <i>CLUPEA PALLASI MARISALBI</i> BERG FROM DVINA BAY OF THE WHITE SEA IN AUTUMN	86
V. K. Golovanov, D. S. Kapshaj. THE RESPONSES OF THE JUVENILES OF SOME FISH SPECIES TO A CONTINUOUS WATER TEMPERATURE RISE	95
Yu. V. Venzhik, V. V. Talanova, A. F. Titov, E. A. Miroslavov. THE ULTRASTRUCTURE OF CHLOROPLASTS IN WHEAT DURING COLD ADAPTATION AND ABA INFLUENCE	102
N. A. Galibina, E. N. Terebova, L. L. Novitskaya, I. N. Sofronova. NONSTRUCTURAL CARBOHYDRATES DYNAMICS IN THE ORGANS AND TISSUES OF TWO-YEAR-OLD SEEDLINGS OF <i>BETULA PENDULA</i> AND <i>BETULA PUBESCENCE</i> DURING THE GROWING SEASON	108
I. M. Dzyubuk, <u>L. P. Ryzhkov</u> . GROWTH AND SURVIVAL OF RAINBOW TROUT FINGERLINGS IN A FISH FARM IN KARELIA	117
M. A. Vishnyakova, V. A. Koshkin, G. P. Egorova, L. Yu. Novikova, I. I. Matvienko. THE PHOTOPERIOD AND TEMPERATURE SENSITIVITY OF COMMON BEAN (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L.) IN THE NORTH-WEST OF RUSSIA	123
N. S. Repkina, V. V. Talanova, A. F. Titov, I. V. Bukareva. WHEAT RESPONSE TO SEPARATE AND COMBINED IMPACT OF LOW TEMPERATURE AND CADMIUM	133
E. M. Zubova, N. A. Kashulin. MODERN FEATURES OF THE MORPHOLOGY AND GROWTH OF SCALES IN SPARSELY RAKERED WHITEFISH <i>COREGONUS LAVARETUS LAVARETUS</i> (<i>COREGONIDAE</i>) IN LAKE IMANDRA UNDER INTENSIVE INDUSTRIAL POLLUTION	140
I. V. Sukhovskaya, E. V. Borvinskaya, I. N. Bakhmet, N. N. Nemova, L. P. Smirnov. THE LEVEL OF GLUTATHIONE AND THE ACTIVITY OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE IN MUSSELS <i>MYTILUS EDULIS</i> L. UNDER TEMPERATURE VARIATIONS	150

M. A. Nazarova, O. B. Vasilyeva, P. O. Ripatti, N. N. Nemova. THE CONCENTRATION OF LIPID COMPONENTS IN THE MUSCLES OF RAINBOW TROUT <i>PARASALMO MYKISS</i> (WALBAUM, 1972) DEPENDING ON THE PRE-FIXATION PERIOD	157
V. V. Lavrova, E. N. Ikkonen, E. M. Matveeva, <u>M. I. Sysoeva</u> . THE RESPONSE OF THE STOMATAL APPARATUS OF POTATO PLANTS TO DAILY SHORT-TERM TEMPERATURE DROPS AND NEMATODE INFESTATION	163
E. A. Vdovichenko, R. U. Vysotskaya. THE EFFECT OF WASTEWATER FROM THE KOSTOMUKSHA IRON-ORE MINING AND CONCENTRATION MILL ON LYSOSOMAL ENZYME ACTIVITY IN ROACH	167
L. V. Vetchinnikova, T. Yu. Kuznetsova, A. F. Titov. EFFECT OF CADMIUM ON <i>IN VITRO</i> MORPHO- AND ORGANOGENESIS IN BIRCH.	174
N. M. Kaznina, A. F. Titov, Yu. V. Batova. THE CONTENT OF NON-PROTEIN THIOLS IN ROOT CELLS OF WILD PERENNIAL GRASSES (<i>PHLEUM PRATENSE</i> L. AND <i>ELYTRIGIA REPENS</i> L.) TREATED WITH CADMIUM AND LEAD	182
O. N. Lebedeva, T. S. Nikolaevskaya, A. F. Titov. GENETIC AND EPIGENETIC VARIABILITY OF SUPPRESSED AND TEMPERATURE-DEPENDENT CHLOROPHYLL DEFICIENCY IN <i>FESTUCA PRATENSIS</i> HUDS	188
SHORT COMMUNICATIONS	
I. L. Golovanova, G. A. Urvantseva. EFFECTS OF LEAD ON GLYCOSIDASE ACTIVITY IN INTESTINAL MUCOSA IN FISH	195
E. A. Khizhkin, V. D. Yunash, V. A. Ilyukha, I. A. Vinogradova, A. V. Morozov, N. G. Timeyko. REPRODUCTION AND PUBERTY IN RATS EXPOSED TO CONSTANT DARKNESS	200
V. K. Bolondinskii, L. M. Vilikainen. RESEARCH OF PHOTOSYNTHESIS LIGHT DEPENDENCE IN KARELIAN BIRCH AND COMMON (SILVER) BIRCH IN DIFFERENT MINERAL NUTRIENT AVAILABILITY SETTINGS	207
I. A. Nilova, A. F. Titov. THE DYNAMICS OF THERMOTOLERANCE IN WHEAT PLANTS DEPENDING ON THE INTENSITY OF HIGH TEMPERATURE INFLUENCE	214
T. N. Ilyina, I. V. Baishnikova. VITAMINS A AND E CONTENT IN THE CORTICAL AND MEDULLARY KIDNEY LAYERS OF MAMMALS	218
A. R. Unzhakov, N. N. Tyutyunnik, L. B. Uzenbaeva, I. V. Baishnikova, E. P. Antonova, N. P. Chernobrovkina, E. V. Robonen, V. A. Ilyukha. PHYSIOLOGICAL STATE OF AMERICAN MINK KITS (<i>MUSTELA VISON</i>) UNDER THE EFFECT OF EXTRACT FROM PINE NEEDLES ENTICED IN L-ARGININE	222
G. A. Zhulai, E. K. Oleinik, P. N. Kravchenko, A. V. Churov, V. M. Oleinik, A. V. Golovin, V. A. Toller, K. A. Ostrovskii. ANALYSIS OF CELLULAR IMMUNITY IN PATHOLOGIES ACCOMPANIED BY THE DEVELOPMENT OF IMMUNE SUPPRESSION	228
DATES AND ANNIVERSARIES	
V. A. Ilyukha, Lyudmila B. Uzenbaeva (on the 70 th anniversary)	234
A. L. Rabinovich, Rimma U. Vysotskaya (on the 70 th anniversary)	238
REVIEWS AND BIBLIOGRAPHY	243
BEREAVEMENTS	
A. F. Titov, N. P. Budykina, V. V. Talanova. Stanislav N. Drozdov (1930–2014)	245
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	247

Научное издание

**Труды Карельского научного центра
Российской академии наук**
№ 5, 2014

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

*Печатается по решению
Президиума Карельского научного центра РАН*

Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС77-48848 от 02.03.2012 г.
выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций

Редактор А. И. Мокеева
Оригинал-макет Н. Н. Сабанцева

Подписано в печать 23.10.2014. Формат 60x84¹/₈.
Гарнитура Pragmatica. Печать офсетная. Уч.-изд. л. 25,9. Усл. печ. л. 29,5.
Тираж 500 экз. Заказ 239.

Карельский научный центр РАН
Редакционно-издательский отдел
185003, г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50