

Карельский научный центр
Российской академии наук

ТРУДЫ

КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

№ 11, 2015

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Петрозаводск
2015

Научный журнал
Труды Карельского научного центра
Российской академии наук
№ 11, 2015
Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Scientific Journal
Transactions of the Karelian Research Centre
of the Russian Academy of Sciences
№ 11, 2015
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.; 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.; А. М. КРЫШЕНЬ (зам. главного редактора), д. б. н.; Е. В. КУДРЯШОВА, д. флс. н., проф.; В. В. МАЗАЛОВ, д. ф.-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.; A. M. KRYSHEN' (Deputy Editor-in-Chief), DSc (Biol.); E. V. KUDRYASHOVA, DSc (Phil.), Prof.; V. V. MAZALOV, DSc (Phys.-Math.), 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.); 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, 2015
© Институт биологии Карельского
научного центра РАН, 2015
© Институт леса Карельского научного
центра РАН, 2015

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.151.63

ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ У ГЕЛЬМИНТОВ

Л. П. Смирнов¹, Е. В. Борвинская¹, А. А. Кочнева², И. В. Суховская¹

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Петрозаводский государственный университет

Процесс биотрансформации токсических соединений у большинства живых организмов является двухфазным. Основным комплексом фазы I являются ферменты системы цитохрома P450, а фазы II – глутатион S-трансферазы. У гельминтов, в связи с редукцией активности основного комплекса фазы I биотрансформации ксенобиотиков – системы цитохромов P-450, предполагается наличие компенсаторных изменений других компонентов биохимической защиты, в том числе усиление метаболической роли ферментов второй фазы биотрансформации, направленное на преодоление стресса, вызванного действием токсинов. Исходя из этого, ключевую роль в механизмах детоксикации у гельминтов могут принимать на себя глутатион S-трансферазы. Известно, что глутатион S-трансферазы – это эволюционно древнее семейство мультифункциональных ферментов, которые участвуют в детоксикации потенциально опасных молекул экзо- и эндогенного происхождения (канцерогены, лекарственные препараты, продукты перекисного окисления и др.), катализируя реакции конъюгации органических молекул с восстановленным глутатионом. В настоящем обзоре проанализировано современное состояние исследований глутатион S-трансфераз гельминтов, представлена информация по выделению и изучению изоферментного состава цитозольных глутатион S-трансфераз (сGST) у гельминтов и их сходству с соответствующими ферментами хозяев. Проведен сравнительный анализ спектра изоферментов GST у представителей класса *Trematoda*, *Cestoda*, *Nematoda*. Показано, что цитозольные глутатион S-трансферазы у паразитов как проявляют сходство с сGST хозяев, так и имеют некоторые существенные структурные, биохимические и молекулярно-биологические отличия. В статье также приведены данные по номенклатуре и классификации ферментов. Показано, что изучение энзиматических систем, специфичных для паразита, способствует обнаружению белков, играющих решающую роль при выживании в хозяине, что может оказаться существенным при развитии методов химиотерапии паразитозов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: глутатион S-трансферазы; трематоды; цестоды; нематоды.

**L. P. Smirnov, E. V. Borvinskaya, I. V. Sukhovskaya, A. A. Kochneva.
GLUTATHIONE S-TRANSFERASES IN HELMINTHS**

The process of biotransformation of toxic compounds in living organisms typically comprises two phases. The main complex of phase I is the P-450 cytochrome enzymatic sys-

tem; in phase II it is glutathione S-transferase enzymes. In helminths the activity of the P-450 cytochrome system is reduced, wherefore compensatory changes of other components of biochemical protection, including the strengthening of the metabolic role of the enzymes of the second phase of biotransformation, can be hypothesized. Glutathione S-transferases may thus assume the key role in detoxification processes in helminths. Glutathione S-transferases are an evolutionarily ancient family of multifunctional enzymes which participate in detoxification of potentially dangerous exo- and endogenous molecules (carcinogens, drugs, peroxidation products, etc.) by catalyzing the conjugation of organic molecules with reduced glutathione. In the present review the current state of research on glutathione S-transferases in helminths has been analyzed, and information on the isolation and study of the isoenzyme spectrum of cytosolic glutathione S-transferases (cGST) of helminths and their hosts is given. The comparative analysis of the range of GST isoenzymes in different members of classes *Trematoda*, *Cestoda*, *Nematoda* was carried out. Both similarities and essential differences of cGST of parasites and their hosts are shown at the structural, biochemical and molecular levels. Data on the nomenclature and classification of the enzymes are also presented. It is demonstrated that studies of parasite-specific enzymatic systems contribute to the detection of the proteins playing a crucial role in the helminth survival in the host and are essential for the development of anthelmintic therapy.

Key words: glutathione S-transferase; classification; trematodes; cestodes; nematodes.

Половозрелые особи гельминтов, обитающие исключительно в средах первого порядка, подвергаются воздействию широкого круга чужеродных молекул, включающих вторичные метаболиты диеты хозяина, компоненты его иммунной защиты, разного рода поллютанты из сред второго порядка, а также антигельминтные препараты. Большинство паразитов имеет сниженные возможности обмена веществ из-за активного использования метаболизма хозяина, поэтому их выживание сильно зависит от ограниченного числа собственных метаболических путей.

Процесс биотрансформации токсических соединений у большинства живых организмов является двухфазным. Основным комплексом фазы I являются ферменты системы цитохрома P450 (CYP450), а фазы II – глутатион S-трансферазы (GST) [Precious, Barrett, 1989]. Глутатион S-трансферазы (E. C. 2.5.1.18) – это эволюционно древнее семейство мультифункциональных энзимов, которые участвуют в детоксикации потенциально опасных молекул экзо- и эндогенного происхождения (канцерогены, лекарственные препараты, продукты перекисного окисления и др.), катализируя реакции конъюгации ксенобиотиков с восстановленным глутатионом (GSH) [Armstrong, 1997].

Ферменты группируются в три подсемейства согласно их субклеточной локализации: цитозольные или канонические, митохондриальные и микросомальные. Цитозольные GST (cGST) – это наиболее многочисленная и хорошо исследованная группа ферментов. Их номенклатура основана на классификации

канонических GST человека и обозначается буквами греческого или латинского алфавита. Она используется для таксономии GST не только всех видов позвоночных, но и других организмов, как эукариот, так и прокариот [Hayes et al., 2005]. Классы GST, проявляющие организменную специфику, обнаружены только у представителей определенных царств или типов, например, лямбда (L), фи (F), тау (U) у растений, дельта (D), эпсилон (E) у насекомых и бета (B) у прокариот. Такие классы, как альфа (A), мю (M), пи (P), тэта (T), сигма (S), зета (Z) и омега (O), встречаются не только у млекопитающих, но и могут быть обнаружены в любом организме, в том числе у гельминтов.

Для классификации cGST, выявленных у разных организмов, используется ряд критериев [Sheehan et al., 2001], базирующихся на сравнении первичной структуры исследуемого фермента с таковой известных cGST млекопитающих. Кроме того, критерии сравнительного анализа включают иммунную специфику, кинетические свойства (субстратная специфичность и чувствительность к ингибиторам), особенности третичной (строение активного центра) и четвертичной структуры мономеров, благодаря которой образуется димерная форма. Хотя мономеры могут осуществлять катализ независимо, тем не менее показано, в том числе на cGST, выделенных из *Plasmodium falciparum* [Liebau et al., 2005], что ферменты проявляют активность в виде димеров.

Глутатион S-трансферазы могут играть жизненно важную роль в метаболизме токсинов у гельминтов, в связи с критическими

функциональными изменениями в каскаде реакций детоксикации на уровне ферментов первой фазы биотрансформации. Так, известно, что за исключением некоторых протозойных паразитов, таких как эпимастиготы *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), *T. brucei* (Plimmer and Bradford, 1899), *Plasmodium bergeri* (Vincke and Lips, 1948) и *Leishmania donovani* (Ross, 1903), у гельминтов активность ферментов системы CYP450 либо не обнаруживается [Precious, Barret, 1989], либо крайне низка. Например, у половозрелой особи *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) скорость метаболического преобразования 7-этоксирезорурфина (субстрата цитохромов) в резорурфин в 10 000 раз ниже, чем в микросомах печени крыс [Cvilinik et al., 2009]. В связи с этим у гельминтов предполагается наличие компенсаторных изменений других компонентов биохимической защиты, в том числе усиление метаболической роли второй фазы биотрансформации, направленное на преодоление стресса, вызванного действием токсинов.

В настоящей работе проанализированы литературные данные по выделению, изучению изоферментного состава и номенклатуре cGST, которые позволяют провести сравнительный анализ структуры и функций этих ферментов у гельминтов и их хозяев.

Глутатион S-трансферазы у трематод

Печеночная двуустка *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) инфицирует широкий круг видов млекопитающих, в том числе человека. Экономические потери от фасциолеза в животноводческих хозяйствах мира составляют более 3 млрд долларов в год. К 2009 году в мире насчитывалось 2,4 миллиона человек, инфицированных *F. hepatica*, а риску заражения подверглось более 180 миллионов. Поэтому неудивительно, что данная трематода является одним из важных объектов биохимических исследований специфики метаболизма гельминтов, в результате которых могут быть получены знания, необходимые при создании эффективных средств борьбы с паразитами. В частности, представители суперсемейства cGST рассматриваются как кандидаты на создание вакцин против разных видов паразитических червей [Brophy, Pritchard, 1994].

Дигенеи характеризуются очень высоким уровнем активности cGST. У *F. hepatica* концентрация ферментов, экстрагируемых из тканей, может достигать 3 % от общего количества водорастворимых белков [Hillyer et al., 1992], при этом фермент представлен множественными изоформами. Методом аффинной хроматографии выделено до пяти белковых форм, которые

по степени взаимодействия с GSH-матрицей могут быть разделены на группы с «высоким» и «низким» сродством [Brophy et al., 1990]. При этом 75–90 % активности приходилось на долю «истинных» cGST, т. е. проявляющих максимальное сродство к GSH. Все изоформы, как показано методом электрофореза в полиакриламидном геле, представляют собой белки с молекулярными массами 26 и 26,5 килодальтон (кДа) [Wijffels et al., 1992]. Активные формы фермента имеют димерную структуру, молекулярная масса которой, определяемая методом гель-хроматографии, составляет 43–47 кДа. Анализ аминокислотной последовательности N-концевого региона показал высокий уровень гомологии с cGST млекопитающих, отнесенных к M классу. Химэйл с соавторами [Chemale et al., 2006] при протеомном анализе выявили у *F. hepatica* до десяти изоформ cGST. Изучение масс-спектров первичной структуры ферментов показало, что кроме количественно преобладающих cGST M класса присутствовали белки, которые по участкам аминокислотных последовательностей можно классифицировать как принадлежащие энзимам S и O классов. Известно, что cGST S класса принимают активное участие в синтезе простагландинов, выполняя функции простагландинсинтетаз. Предполагается, что простагландины у гельминтов участвуют в реакциях супрессии иммунного ответа хозяина [Belley, Chadee, 1995]. Поэтому выявление cGST S класса у *F. hepatica* может свидетельствовать об использовании паразитом этого метаболического пути для подавления иммунного ответа хозяина [LaCourse et al., 2012]. Стоит отметить, что у близкородственной *F. gigantica* (Linnaeus, 1758) в первичной последовательности аналогичных cGST S класса обнаруживаются четыре аминокислотные замены, вероятно связанные с географической локализацией трематоды (Египет, Таиланд, Индия) [Morphew et al., 2012].

Другая группа трематод, вызывающая повышенный интерес исследователей, относится к роду *Schistosoma*. Это неудивительно, поскольку шистозомоз широко распространен в мире – им страдает более 200 миллионов человек, и более 800 тысяч смертей в год так или иначе связаны с этим паразитозом [Taylor et al., 1988]. В цитоплазматическом экстракте *S. mansoni* выявлено три изофермента cGST (SmGST-1, SmGST-2, SmGST-3) с M_r субъединиц 28,5 кДа [O'Leary, Трасу, 1988]. В дальнейшем было выявлено, что в комплексе cGST есть необычный изофермент, состоящий из субъединиц с M_r 26 кДа и отличавшийся от остальных изоформ взаимодействием с окисленной,

а не с восстановленной формой GSH [O'Leary et al., 1992]. Этот изоэнзим преимущественно катализировал конъюгацию модельного эпоксида – 1,2-эпокси-3-р-нитрофеноксипропана и детоксикацию дихлорвоса (препарат против шистозомоза) [O'Leary, Tracy, 1991]. Для сGST сосальщика характерна мозаичная структура, так как обнаружены участки с набором последовательностей, характерных для А и М классов, тогда как в целом уровень гомологии с этими ферментами млекопитающих по аминокислотному составу был низким [Taylor et al., 1988]. Аналогичные структурные особенности описаны и у сGST *S. japonicum*, родственной *S. mansoni* [Walker et al., 1993]. Основные отличия между ферментами этих гельминтов заключались в том, что сGST *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) по общим каталитическим свойствам относительно ингибиторов была сходна с сGST М класса млекопитающих, а сGST *S. japonicum* (Weinland, 1858) проявляла свойства энзимов как А, так и М классов.

В странах Восточной и Юго-Восточной Азии широко распространен клонорхоз – гельминтоз, вызываемый печеночными сосальщиками *Clonorchis sinensis* (McConnell, 1874), которыми заражено более 7 млн человек [Crompton, 1999]. Из *C. sinensis* выделено два изофермента сGST с Mr 28 и 26 кДа, молярное соотношение между которыми составило 14:1 [Kang et al., 2001]. Данные филогенетического анализа последовательностей аминокислотного состава 28 кДа сGST позволили отнести этот изофермент к S классу, в то время как 26 кДа изофермент классифицирован как представитель М класса [Kang et al., 2001; Hong et al., 2001].

Помимо клонорхоза население Юго-Восточной и Восточной Азии подвержено системной инвазии трематодами *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878), вызывающими острые и хронические воспалительные процессы в легких. В ходе исследований в комплексе сGST *P. westermani* (Kerbert, 1878) выявлены два изофермента. Изоэнзим с Mr мономера 28 кДа (Pw28GST) на 41–45 % был сходен с 28-кДа GST шистозом [Hong et al., 2000]. Кроме того, у выделенного энзима обнаружено 58 % гомологии в N-концевом каталитическом домене с простагландин синтетазой крысы, курицы и кальмара, что позволило классифицировать его как фермент S класса. Этот фермент был активен относительно продуктов перекисного окисления липидов, таких как третбутил гидропероксид, транс-2-ноненаль и транс,транс-декаеналь. Также выделена и клонирована GST с Mr 26 кДа (Pw26GST), аминокислотная последовательность которой была на 48–72 % сходна с аналогичными 26-кДа

GST других трематод [Kim et al., 2007]. При построении филогенетического древа выяснилось, что этот фермент попадает в один кластер с GST М класса Sm26GST-1 *S. mansoni*, а также мышей, крыс и кур. Но у этого фермента есть особенность, которая связана с потерей серина 68, который является одним из десяти консервативных аминокислот в активном сайте фермента, являющихся классификационной характеристикой GST М класса. Предполагается, что отсутствие этой аминокислоты приводит к низкой активности Pw26GST с транс-4-фенил-3-бутен-2-оном, специфическим субстратом GST М класса млекопитающих.

Таким образом, по всей видимости, сGST играют важную роль в метаболизме трематод, что обуславливает высокий уровень экспрессии фермента у данных организмов. При этом сGST класса S могут играть важную роль в приспособлении трематод к ведению паразитического образа жизни и адаптации к иммунному ответу хозяина. «Мозаичные» (промежуточные) характеристики некоторых изоформ сGST свидетельствуют об их архетипичности, так как расщепление сGST на канонические классы М и А, по-видимому, произошло позднее, при становлении позвоночных.

Глутатион S-трансферазы у цестод

Цестода *Taenia solium* (Linnaeus, 1758) – опасный паразит человека как на личиночной (цистицерки), так и на взрослой стадиях. Цистицеркоз является широко распространенным зоонозом в развивающихся странах Азии и Латинской Америки. Например, результаты серологических исследований показали, что более 3 % от общей численности населения Мехико заражены цистицеркозом [Vibanco-Perez et al., 1999]. Комплекс сGST, выделенный из цистицерков *T. solium* по субстратной специфичности имел некоторое сходство с сGST А и М классов млекопитающих и значительно отличался от сGST Р и Т классов. Пул изоформ фермента включал массивную 26,5 кДа (SGSTM1) и минорную 25,5 кДа (SGSTM2) формы. Компьютерный поиск в базах данных по белкам показал, что набор N-концевых аминокислотных последовательностей обоих имел высокий уровень гомологии с таковыми ферментов М класса различных организмов, а между собой эти последовательности были сходны на 40 % [Vibanco-Perez et al., 2002]. Анализ свойств доминирующей изоформы 26,5 кДа показал, что нативный фермент является димером, молекулярная масса которого составляет 60 ± 4 кДа. Изоформа стабильно активна в диапазоне pH 4,5–8,5 и при

температуре 10–40°. Активность сохраняется вплоть до 75°. По субстратной специфичности и чувствительности к ингибиторам фермент был сходен с cGST млекопитающих как А, так и М класса [Plancarte et al., 2004]. Нгуен с соавторами [Nguyen et al., 2010] выделили из цистицерков *T. solium* изоформу, которая, по их мнению, является ферментом, сходным с cGST S класса. Эти сведения весьма противоречивы, поскольку полученная cGST блокируется ингибиторами, специфичными для изоформ А и М классов, хотя есть данные о том, что cGST гельминтов А, М и S классов могут иметь перекрывающуюся чувствительность к специфическим ингибиторам [Torres-Rivera, Landa, 2008].

Получены и описаны рекомбинантные cGST из цестод *Echinoccus granulosus* (Batsch, 1798) и *E. multilocularis* (Leuckart, 1863), взрослые формы которых паразитируют у хищников сем. Псовых, а личиночные формы, попадая в человека, локализуются главным образом в печени и легких и формируют гидатидные цисты, вырастающие до значительных размеров. Эхинококкоз в 90 % случаев приводит к летальному исходу в течение 10 лет после постановки диагноза [Liebau et al., 1996a; Harispe et al., 2010]. Молекулярные массы мономеров *E. multilocularis* составили 25–25,5 кДа. Если по структуре эти cGST были сходны с таковыми М класса млекопитающих, то относительно взаимодействия с субстратами и ингибиторами им, так же как и, например, cGST *S. mansoni*, свойственна мозаичность, то есть проявление свойств, характерных для ферментов не только М класса, но и А и Р классов.

У *Moniezia expansa* (Rudolphi, 1810), паразитирующей в кишечнике овец, были выделены четыре формы cGST, для которых не была обнаружена явная классовая взаимосвязь ни с одной из cGST млекопитающих. Изучение N-концевой последовательности указало на топологическое сходство с ферментами А и М классов [Brophy et al., 1989]. Основная изоформа EII, на которую приходится до 50 % от общей активности с универсальным для цитозольных GST субстратом – 1-хлор-2,4-динитробензолом, катализировала конъюгацию ряда вторичных продуктов перекисного окисления липидов серий транс-алк-2-еналов и транс, транс-2,4-диеналов.

Таким образом, имеющиеся данные показывают, что у цестод наиболее часто встречаются изоформы cGST, по структуре сходные с ферментами А и М классов млекопитающих. Анализ субстратной специфики выделенных ферментов у гельминтов свидетельствует в пользу предположения об эволюционной древности этих ферментов, дивергенция которых по строению

активного центра на классы, описанные у млекопитающих, произошла на более поздних этапах. Присутствие изоформ S класса у представителей цестод требует уточнения.

Глутатион S-трансферазы у нематод

В качестве модельных объектов при исследовании cGST нематод наиболее часто используются круглые черви, представляющие опасность для человека и домашних животных, такие как, например, *Ascaris suum* (Goeze, 1782). Детальное и всестороннее описание cGST этого паразита произведено группой Либбау с соавторами [Liebau et al., 1997]. По результатам изучения аминокислотной последовательности построена топологическая модель фермента, которая показала отсутствие у белка структур, характерных для cGST А класса (экстраспираль над активным сайтом) и М класса (специфическая Мю-петля) млекопитающих, но продемонстрировала сильную топологическую связь cGST гельминта с ферментами Р класса. Из родственной *A. suum* нематоды *Ascaridia galli* (Schrank, 1788) выделена cGST, которая проявила высокий уровень специфической активности в реакции GSH-зависимой изомеризации простагландина PGH в PGE и заметный уровень активности при изомеризации PGH в PGD, что позволило идентифицировать этот фермент как cGST S класса [Meyer et al., 1996].

Анализ cGST, выделенных из нематоды *Setaria cervi* (Rudolphi, 1819), паразита крупного рогатого скота, показал, что M_r нативного фермента составила 49,2 кДа при M_r мономеров 24,6 кДа [Ahmad et al., 2008]. Двумерным электрофорезом не выявлено дополнительных фракций, что позволяет считать энзим гомодимером. cGST катализировала восстановление кумен гидропероксида, что указывает на возможность функционирования фермента как селен-независимой глутатион пероксидазы. У родственной *S. digitata* M_r мономера, определенный методом электрофореза, составил ~27 кДа, а гель-хроматография на носителе Sephacryl S-200 показала, что M_r нативного гомодимера составляет ~54 кДа. Верхний предел температурного диапазона активности фермента не превышал 40 °C [Srinivasan et al., 2011]. Информация, позволяющая сделать выводы о структуре выделенных белков, в данных работах, к сожалению, отсутствует.

Нематода *Onchocercus volvulus* (Bickel, 1982) вызывает повышенный интерес исследователей в связи с тем, что очень опасна для человека, единственного окончательного хозяина гельминта. Взрослые паразиты локализуются

в фиброзных узлах, располагающихся под кожей, апоневрозом мышц, надкостницей. Личинки (микрофилярии) обитают главным образом в поверхностных слоях кожи, часто в глазах («речная слепота»), реже в лимфатических узлах и внутренних органах и очень редко в крови. В эпизоотически значимых регионах Африки, Аравийского полуострова, Центральной и Южной Америки инвазировано около 18 млн человек и более 50 млн подвержены риску заражения [Perbandt et al., 2005]. В водорастворимой белковой фракции, выделенной из самок *O. volvulus*, выявлены изоферменты cGST с M_r мономеров 24, 25 и 32 кДа и минорная фракция – 36 кДа [Salinas et al., 1994]. M_r энзиматически активных cGST (Ov-GST1, Ov-GST2, Ov-GST3), определенный методом гель-хроматографии, находится в диапазоне 50–60 кДа, то есть эти ферменты функционируют в форме димеров [Liebau et al., 1994]. Получен клон мономера с M_r 24 кДа (OvGST2), который по аминокислотной последовательности был сходен с cGST P класса млекопитающих на 45 % и свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans* (Steindachner, 1876) на 60 % [Liebau et al., 1996b]. По общей структуре OvGST2 демонстрирует как сходство с cGST P класса, так и некоторые важные отличия. Например, активный центр G-сайта, отвечающий за присоединение GSH, очень сходен с таковым человеческого «двойника». В свою очередь, H-сайт, отвечающий за присоединение гидрофобных молекул, более открыт и доступен для взаимодействия, что объясняет различия между ферментами в активности с одними и теми же субстратами [Liebau et al., 1997; Perbant et al., 2005]. Высокая степень сходства с OvGST2 по аминокислотной последовательности (79 %) обнаружена у cGST, выделенных из родственных филярий *Brugia malayi* (Brug, 1927) и *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877), паразитирующих в лимфатических узлах человека и, соответственно, также отнесенных к P классу [Rathaur et al., 2003].

Другой изофермент *O. volvulus* OvGST1 (масса субъединицы 32 кДа) представляет собой N-гликозилированный фермент, который имеет 38 % сходства по аминокислотной последовательности с cGST S класса головоногих моллюсков [Sommer et al., 2001], на 41 % сходен GST-11 *C. elegans* (cGST S класса), на 37 % с гематопозитическими GSH-зависимыми простагландин D синтетазы (PGDS) крысы (*Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)), курицы (*Gallus gallus* (Linnaeus, 1758)) и мыши (*Mus musculus* (Linnaeus, 1758)). Интересно, что OvGST1 проявила больше сходства с PGDS человека (32 %), чем cGST S класса трематоды

Schistosoma haematobium (Bilharz, 1852) (28 %), родственной *S. mansoni* [Perbandt et al., 2008]. Рекомбинантная форма OvGST1 селективно изомеризовала PGH_2 в PGD_2 , в то время как другие известные cGST S класса не отличаются избирательностью и катализируют превращение простагландина PGH_2 не только в PGD_2 , но и в PGF_2 и PGE_2 [Sommer et al., 2003].

Изофермент *O. volvulus* OvGST3 сначала был отнесен к обширной группе белков, эволюционно связанных с cGST T класса [Liebau et al., 2000], однако затем систематическая принадлежность этого фермента была пересмотрена, и теперь он отнесен к cGST O (омега) класса [Campbell et al., 2001]. К этому ферменту проявляется повышенный интерес исследователей, поскольку доказано участие cGST O класса в антиоксидантной защите клеток при окислительном стрессе [Board, 2011]. В частности, OvGST3 активируется в присутствии транс-2-ноненаля, продукта перекисного окисления липидов. Кроме того, показано, что трансгенные *C. elegans*, которым интродуцировали ген OvGST3, обладали существенно более высокой выживаемостью по сравнению с таковыми дикого типа, как в условиях внутриклеточного окислительного стресса, вызванного редокс-активным хиноном (5-гидрокси-1,4-нафтохинон), так и при имитации окислительного стресса в окружающей среде (хозяин) с помощью активации гипоксантин/ксантин оксидазной системы, стимулирующей образование высоких концентраций перекиси водорода (H_2O_2) [Kampkötter et al., 2003]. Для cGST O класса характерна также активность тиол оксидоредуктазы, поэтому весьма вероятно участие OvGST3 в реакциях реверсивного S-глутатионирования и глутатион-связанной редокс регуляции S-глутатионированных белков, накапливающихся в клетке при окислительном стрессе [Liebau et al., 2008].

В цитозольных экстрактах нематод *Heligmosomoides polygyrus* (Dujardin, 1845), паразитирующих в тонком кишечнике мелких грызунов, обнаружены четыре изоформы cGST с M_r мономеров 23 и 24 кДа, из которых два энзима с pI 8,1 и 5,0 были количественно доминирующими, а ферменты с pI 5,3 и 5,8 – минорными [Brophy et al., 1994]. По результатам изучения аминокислотной последовательности белковой цепи рекомбинантной формы одной из доминирующих cGST было сделано предположение, что данная cGST может относиться к новому классу, который предложено было обозначить как N (ню) класс (HpGSTN2–2) [Campbell et al., 2001]. Дальнейшие исследования показали наличие структурного сходства N-конца молекулы (G сайт) на 31–34 %

с ферментами S класса дрозофилы, человека, крысы и мыши. Строение гидрофобной части активного сайта HpGSTN2–2 имело существенные отличия от аналогичного сайта cGST других классов и других организмов. Это привело авторов к согласию с Кэмпбеллом и соавторами [Campbell et al., 2001] о необходимости выделения HpGSTN2–2 в отдельный класс.

Большую экономическую проблему для сельскохозяйственных сообществ представляет кишечный паразит жвачных стронгилида *Haemonchus contortus* (Cobb, 1898). Особенностью этой нематоды является питание исключительно кровью хозяина. Из тканей *H. contortus* выделена cGST (HcGST-1), которая имела 70 % сходства по аминокислотной последовательности с ферментом, обнаруженным в экскреторно-секреторном окружении паразита [van Rossum et al., 2004]. По мнению авторов, HcGST-1 относится к новому классу cGST (N), специфичному для нематод. HcGST-1 взаимодействует с гематином, что характерно для ряда cGST A класса млекопитающих, которые, как предполагается, участвуют в детоксикации и/или транспорте гема [Mannervik et al., 1985].

Аналогичные гем-связывающие cGST были найдены у других нематод, питающихся кровью. Изоформа Ac-GST-1 с M_r мономера 24 кДа была выделена из кривоголовки *Ancylostoma caninum* (Dubini, 1843) и найдена только в соматических и экскреторно-секреторных экстрактах из взрослых паразитов. Фермент имел 58%-е сходство по аминокислотной последовательности с cGST *H. contortus* (HcGST-1), 65 % идентичности с cGST кишечных паразитов *H. polygyrus* (Dujardin, 1845) (HpGSTN2–2) и свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans* (Osche, 1952) (CeGST-5), в то время как уровень сходства с cGST шистозом (Sj28) и GST-A3 человека не превышал 30 % [Zhan et al., 2005]. У некоего *Necator americanus* (Stiles, 1902), также питающегося кровью, методом двумерного электрофореза выявлено до восьми изоферментов cGST, из которых идентифицировано три изоэнзима – Na-GST-1, Na-GST-2 и Na-GST-3, проявивших структурное сходство с Ac-GST-1 на 69, 64 и 54 % соответственно [Zhan et al., 2010]. Изучение субстратной специфики показало, что эти изоферменты, так же как и Ac-GST-1 *A. caninum*, проявляли высокую активность в отношении гем/гематин. Это указывает на то, что исследованные ферменты играют важную роль в детоксикации и трафике гема и родственных соединений, появляющихся при потреблении крови данной группой гельминтов. В свою очередь наличие родственных ферментов у нематод других

семейств свидетельствует о широкой распространенности недавно открытого N класса GST среди круглых червей.

Анализ литературы показывает, что данные о структуре и особенностях функционирования изоферментного пула глутатион S-трансфераз носят весьма несистемный и фрагментарный характер. Следует также отметить, что большое количество работ по данной теме было проведено до широкого внедрения современных молекулярно-генетических методов и поэтому являются недостаточно информативными.

До конца не выяснены вопросы номенклатуры глутатион S-трансфераз у паразитических червей, что является общей проблемой при описании этих белков и у других таксонов беспозвоночных [Борвинская и др., 2013]. Вследствие того, что первоначально наиболее полно и подробно были описаны cGST млекопитающих, критерии, разработанные для них, традиционно применяются для классификации всех вновь открываемых энзимов. Однако многие авторы отмечают, что такой подход связан с большими трудностями при попытке описать предковые формы фермента, имеющие промежуточные свойства. Выяснение особенностей строения и функционирования GST гельминтов с этой точки зрения имеет большое значение для пополнения базы данных об эволюции данного фермента, на основе которой возможно создание новых принципов номенклатуры семейства.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии у гельминтов уникальных форм ферментов, изучение которых представляет несомненный интерес в связи с их возможной ролью в приспособлении к паразитическому образу жизни. Несмотря на то что многие cGST гельминтов в большей или меньшей степени схожи с ферментами M, P, S и O классов других организмов, они содержат существенные структурные различия по сравнению с энзимами хозяев, что делает их перспективными кандидатами для разработки паразитоспецифических вакцин. Некоторые успехи в этом направлении уже достигнуты. Например, иммунизация Ac-GST-1 снижала приживаемость *A. caninum* у собак на 40 %, а у хомяков более чем на 50 % [Zhan et al., 2005]. Определенные успехи достигнуты при использовании cGST в качестве вакцин при шистозомозе и фасциолезе [Carpon et al., 1992; Sexton et al., 1990]. Накопление знаний об энзиматических системах, которые либо отсутствуют, либо специфичны для паразита, может обнаружить большое число белков, играющих решающую роль при выживании в хозяине, что может оказаться существенным при развитии методов химиотерапии паразитозов.

Работа выполнена при поддержке средств федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0221-2014-0003 и гранта Президента РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых ведущими научными школами РФ. Проект НШ-1410.2014.4.

Литература

- Борвинская Е. В., Смирнов Л. П., Немова Н. Н. Глутатион S-трансферазы у рыб (мини-обзор) // Труды Карельского научного центра РАН. 2013. № 3. С. 3–9.
- Ahmad R., Srivastava A. K., Walter R. D. Purification and biochemical characterization of cytosolic glutathione-S-transferase from filarial worms *Setaria cervi* // Comp. Biochem. Physiol. Part B. 2008. Vol. 151. P. 237–245.
- Armstrong R. N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione S-transferases // Chem. Res. Toxicol. 1997. Vol. 10. P. 2–18.
- Belley A., Chadee K. Eicosanoid production by parasites: from pathogenesis to immunomodulation? // Parasitol Today. 1995. Vol. 11, No 9. P. 327–34.
- Board P. G. The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics // Drug Metabolism Reviews. 2011. Vol. 43. P. 226–235. doi: 10.3109/03602532.2011.561353.
- Brophy P. M., Southan C., Barrett J. Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa* // Biochem J. 1989. Vol. 262. P. 939–946.
- Brophy P. M., Crowley P., Barrett J. Detoxification reactions of cytosolic glutathione transferases // Mol. Biochem. Physiol. 1990. Vol. 39. P. 155–162.
- Brophy P. M., Ben-Smith A., Brown A. et al. Glutathione S-transferase from the gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* and mammalian liver compared // Comp. Biochem. Physiol. 1994. Vol. 109. P. 585–592.
- Brophy P. M., Pritchard D. I. Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy // Exp. Parasitol. 1994. Vol. 79. P. 89–96.
- Campbell A. M., Teesdale-Spittle P. H., Barrett J. et al. A common class of nematode glutathione S-transferase (GST) revealed by the theoretical proteome of the model organism *Caenorhabditis elegans* // Comp. Biochem. Physiol. Part B. 2001. Vol. 128. P. 701–708.
- Capron A., Dessaint J. P., Capron M., Pierce R. J. Vaccine strategies against schistosomiasis // Immunobiology. 1992. Vol. 184(2–3). P. 282–94.
- Chemale G., Morphew R., Moxon J. V. et al. Proteomic analysis of glutathione transferases from the liver fluke parasite *Fasciola hepatica* // Proteomics. 2006. Vol. 6. P. 6263–6273.
- Cvilinik V., Lamka J., Skálová L. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminthes // Drug Metabolism Reviews. 2009. Vol. 41, No 1. P. 8–26.
- Crompton D. W. T. How much human helminthiasis is there in the world // J. Parasitol. 1999. Vol. 85. P. 397–403. doi: 10.1080/03602530802602880.
- Harispe L., Garcia G., Arbildi P. et al. Biochemical analysis of a recombinant glutathione transferase from the cestode *Echinococcus granulosus* // Acta Tropica. 2010. Vol. 114. P. 31–36. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.12.003.
- Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R. Glutathione transferases // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2005. Vol. 45. P. 51–88.
- Hillyer G. V., Soler de Galanesa M., Battisti G. Fasciola hepatica: host responders and nonresponders to parasite glutathione S-transferase // Exp. Parasitol. 1992. Vol. 75. P. 176–186.
- Hong S., Lee J., Lee D. et al. Molecular cloning and characterization of a mu-class glutathione S-transferase from *Clonorchis sinensis* // Mol. Biochem. Parasitol. 2001. Vol. 115. P. 69–75.
- Hong S. J., Kang S. Y., Chung Y. B. et al. Paragonimus westermani: a cytosolic glutathione S-transferase of a sigma-class in adult stage // Exp. Parasitol. 2000. Vol. 94. P. 180–189.
- Kampkötter A., Volkmann T. E., Hegi de Castro S. et al. Functional analysis of the glutathione S-transferase 3 from *Onchocerca volvulus* (Ov-GST-3): A parasite GST confers increased resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* // J. Mol. Biol. 2003. Vol. 325. P. 25–37.
- Kang S., Ahn I., Park C. et al. Clonorchis sinensis molecular cloning and characterization of 28-kDa glutathione S-transferase // Exp. Parasitol. 2001. Vol. 97. P. 186–195.
- Kim T. Y., Lee J.-Y., Kim T. I. et al. Molecular cloning and enzymatic characterization of a class mu glutathione S-transferase of *Paragonimus westermani* // Parasitol Res. 2007. Vol. 101. P. 1225–1231.
- LaCourse E. J., Perally S., Morphew R. M. et al. The Sigma class glutathione transferase from the liver fluke *Fasciola hepatica* // PLoS Negl. Trop. Dis. 2012. Vol. 6, No 5: e1666. P. 1–14. doi: 10.1371/journal.pntd.0001666.
- Liebau E., Wildenburg G., Walter R. D., Henkle-Dührsen K. A novel type of glutathione S-transferase in *Onchocerca volvulus* // Infection and Immunity. 1994. Vol. 62. P. 4762–4767.
- Liebau E., Müller V., Lucius R. et al. Molecular cloning, expression and characterization of a recombinant glutathione S-transferase from *Echinococcus multilocularis* // Mol. Biochem. Parasitol. 1996a. Vol. 77. P. 49–56.
- Liebau E., Wildenburg G., Brophy P. M. et al. Biochemical analysis, gene structure and localization of the 24 kDa glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* // Mol. Biochem. Parasitol. 1996b. Vol. 80. P. 27–39.
- Liebau E., Eckelt V. H. O., Wildenburg G. et al. Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from *Ascaris suum* // Biochem. J. 1997. Vol. 324. P. 659–666.
- Liebau E., Eschbach M.-L., Tawe W. et al. Identification of a stress-responsive *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase (Ov-GST-3) by RT-PCR differential display // Mol. Biochem. Parasitol. 2000. Vol. 109. P. 101–110.
- Liebau E., De Maria F., Burmeister C. et al. Cooperativity and pseudocooperativity in the glutathione

S-transferase from *Plasmodium falciparum* // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280. P. 26121–26128.

Liebau E., Höppner J., Mühlmeister M. et al. The secretory omega-class glutathione transferase OvGST3 from the human pathogenic parasite *Onchocerca volvulus* // FEBS Journal. 2008. Vol. 275. P. 3438–3453. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06494.x.

Mannervik B., Alin P., Guthenberg C. et al. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. Vol. 82. P. 7202–7206.

Meyer D. J., Muimo R., Thomas M. et al. Purification and characterization of prostaglandin-H isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli* // Biochem. J. 1996. Vol. 313. P. 223–227.

Morphew R. M., Eccleston N., Wilkinson T. J. et al. Proteomics and in Silico Approaches To Extend Understanding of the Glutathione Transferase Superfamily of the Tropical Liver Fluke *Fasciola gigantica* // J. Proteome Res. 2012. Vol. 11. P. 5876–5889. doi: 10.1021/pr300654w.

Nguyen H. A., Bae Y.-A., Lee E.-G. et al. A novel sigma-like glutathione transferase of *Taenia solium* metacystode // Int. J. Parasitol. 2010. Vol. 40. P. 1097–1106. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.03.007.

O'Leary K. A., Tracy J. W. Purification of three cytosolic glutathione S-transferases from adult *Schistosoma mansoni* // Arc. Biochem. Biophys. 1988. Vol. 264. P. 1–12.

O'Leary K. A., Tracy J. W. *Schistosoma mansoni*: Glutathione S-transferase-catalyzed detoxication of dichlorvos // Experimental Parasitology. 1991. Vol. 72. P. 355–361.

O'Leary K. A., Hathaway K. M., Tracy J. W. *Schistosoma mansoni*: single-step purification and characterization of glutathione S-transferase isoenzyme 4 // Exp. Parasitol. 1992. Vol. 75. P. 47–55.

Perbandt M., Höppner J., Betzel C. et al. Structure of the major cytosolic glutathione S-transferase from the parasitic nematode *Onchocerca volvulus* // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280. P. 12630–12636.

Perbandt M., Höppner J., Burmeister C. et al. Structure of the extracellular glutathione S-transferase OvGST1 from the human pathogenic parasite *Onchocerca volvulus* // J. Mol. Biol. 2008. Vol. 377. P. 501–511. doi: 10.1016/j.jmb.2008.01.029.

Plancarte A., Rendon J. L., Landa A. Purification, characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa // Parasitology Res. 2004. Vol. 93. P. 137–144.

Precious W. Y., Barrett J. Xenobiotic metabolism in helminths // Parasitology Today. 1989. Vol. 5, No 5. P. 156–160.

Rathaur S., Fischer P., Domagalski M. et al. *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*: gene comparison and recombinant expression of pi-class related glutathione S-transferases // Exp. Parasitol. 2003. Vol. 103. P. 177–181.

Salinas G., Braun G., Taylor D. W. Molecular characterization and localization of an *Onchocerca volvulus* pi-class glutathione S-transferase // J. Mol. Biol. 1994. Vol. 66. P. 1–9.

Sheehan D., Meade G., Foley V. M., Dowd C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily // Biochem. J. 2001. Vol. 360. P. 1–16.

Sexton J. L., Milner A. R., Panaccio M. et al. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep // J. Immunol. 1990. Vol. 145, No 11. P. 3905–3910.

Sommer A., Nimtz M., Conradt H. S. et al. Structural analysis and antibody response to the extracellular glutathione S-transferases from *Onchocerca volvulus* // Infection and Immunity. 2001. Vol. 69. P. 7718–7728.

Sommer A., Rickert R., Fischer P. et al. A dominant role for extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* is the production of prostaglandin D₂ // Infection and Immunity. 2003. Vol. 71. P. 3603–3606.

Srinivasan L., Mathew M., Karunan T., Muthuswamy K. Biochemical studies on glutathione S-transferase from filarial worm *Setaria digitata* // Parasitol. Res. 2011. Vol. 109. P. 213–219. doi: 10.1007/s00436-010-2227-x.

Taylor J. B., Vidal A., Torpier G. et al. The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned M_r 28K protective antigen of *Schistosoma mansoni* // EMBO J. 1988. Vol. 7. P. 465–472.

Torres-Rivera A., Landa A. Glutathione transferases from parasites: a biochemical view // Acta Tropica. 2008. Vol. 105. P. 99–112.

van Rossum A. J., Jefferies J. R., Rijsewijk F. A. M. et al. Binding of hematin by a new class of glutathione transferase from the blood-feeding parasitic nematode *Haemonchus contortus* // Infection and Immunity. 2004. Vol. 72. P. 2780–2790.

Vibanco-Perez N., Jimenez L., Merchant M. T., Landa A. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium* // J. Parasitol. 1999. Vol. 85. P. 448–453.

Vibanco-Perez N., Jimenez L., Mendoza-Hernandez G., Landa A. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium* // Parasitol. Res. 2002. Vol. 88. P. 398–404.

Walker J., Crowley P., Moreman A. D., Barrett J. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* // Mol. Biochem. Parasitol. 1993. Vol. 61. P. 255–265.

Wijffels G. L., Sexton J. L., Salvatore L. et al. Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathione S-transferases of *Fasciola hepatica* // Exp. Parasitol. 1992. Vol. 74. P. 87–99.

Zhan B., Liu S., Perally S. et al. Biochemical characterization and vaccine potential of a heme-binding glutathione transferase from the adult hookworm *Ancylostoma caninum* // Infection and Immunity. 2005. Vol. 73. P. 6903–6911.

Zhan B., Perally S., Brophy P. M. et al. Molecular cloning, biochemical characterization, and partial protective immunity of the heme-binding glutathione S-transferases from the human hookworm *Necator americanus* // Infection and Immunity. 2010. Vol. 78. P. 1552–1563. doi: 10.1128/IAI.00848-09. Epub 2010 Feb 9.

Поступила в редакцию 24.06.2015

References

- Borvinskaya E. V., Smirnov L. P., Nemova N. N. Glutathione S-transferazy u ryb (mini-obzor) [Glutathione S-transferases in fish (minireview)]. *Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra RAN [Transactions of KarRC RAS]*. 2013. No 3. P. 3–9.
- Ahmad R., Srivastava A. K., Walter R. D. Purification and biochemical characterization of cytosolic glutathione-S-transferase from filarial worms *Setaria cervi*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*. 2008. Vol. 151. P. 237–245.
- Armstrong R. N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione S-transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 1997. Vol. 10. P. 2–18.
- Belley A., Chadee K. Eicosanoid production by parasites: from patho-genesis to immunomodulation. *Parasitol Today*. 1995. Vol. 11, No 9. P. 327–34.
- Board P. G. The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics. *Drug Metabolism Reviews*. 2011. Vol. 43. P. 226–235. doi: 10.3109/03602532.2011.561353.
- Brophy P. M., Southan C., Barrett J. Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Biochem J*. 1989. Vol. 262. P. 939–946.
- Brophy P. M., Crowley P., Barrett J. Detoxification reactions of cytosolic glutathione transferases. *Mol. Biochem. Physiol.* 1990. Vol. 39. P. 155–162.
- Brophy P. M., Ben-Smith A., Brown A., Behnke J. M., Pritchard D. I. Glutathione S-transferase from the gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* and mammalian liver compared. *Comp. Biochem. Physiol.* 1994. Vol. 109. P. 585–592.
- Brophy P. M., Pritchard D. I. Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. *Exp. Parasitol.* 1994. Vol. 79. P. 89–96.
- Campbell A. M., Teesdale-Spittle P. H., Barrett J., Liebau E., Jefferies J. R., Brophy P. M. A common class of nematode glutathione S-transferase (GST) revealed by the theoretical proteome of the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*. 2001. Vol. 128. P. 701–708.
- Capron A., Dessaint J. P., Capron M., Pierce R. J. Vaccine strategies against schistosomiasis. *Immunobiology*. 1992. Vol. 184(2–3). P. 282–94.
- Chemale G., Morphew R., Moxon J. V., Morassutti A. L., LaCourse E. J., Barrett J., Johnston D. A., Brophy P. M. Proteomic analysis of glutathione transferases from the liver fluke parasite *Fasciola hepatica*. *Proteomics*. 2006. Vol. 6. P. 6263–6273.
- Cvilinik V., Lamka J., Skálová L. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminthes. *Drug Methabolism Reviews*. 2009. Vol. 41, No 1. P. 8–26.
- Crompton D. W. T. How much human helminthiasis is there in the world. *J. Parasitol.* 1999. Vol. 85. P. 397–403. doi: 10.1080/03602530802602880.
- Harispe L., Garcia G., Arbildi P., Pascovich L., Chalar C., Zaha A., Fernandes C., Fernandes V. Biochemical analysis of a recombinant glutathione transferase from the cestode *Echinococcus granulosus*. *Acta Tropica*. 2010. Vol. 114. P. 31–36. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.12.003.
- Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005. Vol. 45. P. 51–88.
- Hillyer G. V., Soler de Galanesa M., Battisti G. *Fasciola hepatica*: host responders and nonresponders to parasite glutathione S-transferase. *Exp. Parasitol.* 1992. Vol. 75. P. 176–186.
- Hong S., Lee J., Lee D., Sohn W., Cho S. Molecular cloning and characterization of a mu-class glutathione S-transferase from *Clonorchis sinensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001. Vol. 115. P. 69–75.
- Hong S. J., Kang S. Y., Chung Y. B., Chung M. H., Oh Y.-J., Kang I., Bahk Y. Y., Kong Y., Cho S. Y. *Paragonimus westermani*: a cytosolic glutathione S-transferase of a σ -class in adult stage. *Exp. Parasitol* 2000. Vol. 94. P. 180–189.
- Kampkötter A., Volkmann T. E., Hegi de Castro S., Leiers B., Klotz L.-O., Johnson T. E., Link C. D., Henkle-Dührsen K. Functional analysis of the glutathione S-transferase 3 from *Onchocerca volvulus* (Ov-GST-3): A parasite GST confers increased resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 325. P. 25–37.
- Kang S., Ahn I., Park C., Chung Y., Hong S., Kong Y., Cho S., Hong S. *Clonorchis sinensis* molecular cloning and characterization of 28-kDa glutathione S-transferase. *Exp. Parasitol.* 2001. Vol. 97. P. 186–195.
- Kim T. Y., Lee J.-Y., Kim T. I., Moon K. H., Kang S.-Y., Hong S.-J. Molecular cloning and enzymatic characterization of a class mu glutathione S-transferase of *Paragonimus westermani*. *Parasitol. Res.* 2007. Vol. 101. P. 1225–1231.
- LaCourse E. J., Perally S., Morphew R. M., Moxon J. V., Prescott M. et al. The Sigma class glutathione transferase from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012. Vol. 6, No 5: e1666. P. 1–14. doi: 10.1371/journal.pntd.0001666.
- Liebau E., Wildenburg G., Walter R. D., Henkle-Dührsen K. A novel type of glutathione S-transferase in *Onchocerca volvulus*. *Infection and Immunity*. 1994. Vol. 62. P. 4762–4767.
- Liebau E., Müller V., Lucius R., Walter R. D., Henkle-Dührsen K. Molecular cloning, expression and characterization of a recombinant glutathione S-transferase from *Echinococcus multilocularis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1996a. Vol. 77. P. 49–56.
- Liebau E., Wildenburg G., Brophy P. M., Walter R. D., Henkle-Dührsen K. Biochemical analysis, gene structure and localization of the 24 kDa glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1996b. Vol. 80. P. 27–39.
- Liebau E., Eckelt V. H. O., Wildenburg G., Teesdale-Spittle P., Brophy P. M., Walter R. D., Henkle-Dührsen K. Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. *Biochem. J.* 1997. Vol. 324. P. 659–666.
- Liebau E., Eschbach M.-L., Tawe W., Sommer A., Fischer P., Walter R. D., Henkle-Dührsen K. Identification of a stress-responsive *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase (Ov-GST-3) by RT-PCR differential display. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000. Vol. 109. P. 101–110.
- Liebau E., De Maria F., Burmeister C., Perbandt M., Turella P., Antonini G., Federici G., Giansanti F., Stella L.,

- Lo Bello M., Caccuri A. M., Ricci G. Cooperativity and pseudocooperativity in the glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 26121–26128.
- Liebau E., Höppner J., Mühlmeister M., Burmeister C., Lüersen K., Perbandt M., Schmetz C., Buüttner D., Brattig N. The secretory omega-class glutathione transferase OvGST3 from the human pathogenic parasite *Onchocerca volvulus*. *FEBS Journal.* 2008. Vol. 275. P. 3438–3453. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06494.x.
- Mannervik B., Alin P., Guthenberg C., Jensson H., Tahir M. K., Warholm M., Jornvall H. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. Vol. 82. P. 7202–7206.
- Meyer D. J., Muimo R., Thomas M., Coates D., Isaac R. E. Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli*. *Biochem. J.* 1996. Vol. 313. P. 223–227.
- Morphew R. M., Eccleston N., Wilkinson T. J., McGarry J., Perally S., Prescott M. et al. Proteomics and in Silico Approaches To Extend Understanding of the Glutathione Transferase Superfamily of the Tropical Liver Fluke *Fasciola gigantica*. *J. Proteome Res.* 2012. Vol. 11. P. 5876–5889. doi: 10.1021/pr300654w.
- Nguyen H. A., Bae Y.-A., Lee E.-G., Kim S.-H., Diaz-Camacho S. P., Nawa Y., Kang I., Kong Y. A novel sigma-like glutathione transferase of *Taenia solium* metacystode. *Int. J. Parasitol.* 2010. Vol. 40. P. 1097–1106. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.03.007.
- O'Leary K. A., Tracy J. W. Purification of three cytosolic glutathione S-transferases from adult *Schistosoma mansoni*. *Arc. Biochem. Biophys.* 1988. Vol. 264. P. 1–12.
- O'Leary K. A., Tracy J. W. *Schistosoma mansoni*: Glutathione S-transferase-catalyzed detoxication of dichlorvos. *Experimental Parasitology.* 1991. Vol. 72. P. 355–361.
- O'Leary K. A., Hathaway K. M., Tracy J. W. *Schistosoma mansoni*: single-step purification and characterization of glutathione S-transferase isoenzyme 4. *Exp. Parasitol.* 1992. Vol. 75. P. 47–55.
- Perbandt M., Höppner J., Betzel C., Walter R. D., Liebau E. Structure of the major cytosolic glutathione S-transferase from the parasitic nematode *Onchocerca volvulus*. *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 12630–12636.
- Perbandt M., Höppner J., Burmeister C., Lüersen K., Betzel C., Liebau E. Structure of the extracellular glutathione S-transferase OvGST1 from the human pathogenic parasite *Onchocerca volvulus*. *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 377. P. 501–511. doi: 10.1016/j.jmb.2008.01.029.
- Plancarte A., Rendon J. L., Landa A. Purification, characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa. *Parasitology Res.* 2004. Vol. 93. P. 137–144.
- Precious W. Y., Barrett J. Xenobiotic metabolism in helminthes. *Parasitology Today.* 1989. Vol. 5, No 5. P. 156–160.
- Rathaur S., Fischer P., Domagalski M., Walter R. D., Liebau E. *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*: gene comparison and recombinant expression of π -class related glutathione S-transferases. *Exp. Parasitol.* 2003. Vol. 103. P. 177–181.
- Salinas G., Braun G., Taylor D. W. Molecular characterization and localization of an *Onchocerca volvulus* π -class glutathione S-transferase. *J. Mol. Biol.* 1994. Vol. 66. P. 1–9.
- Sheehan D., Meade G., Foley V. M., Dowd C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 2001. Vol. 360. P. 1–16.
- Sexton J. L., Milner A. R., Panaccio M., Waddington J., Wijffels G., Chandler D., Thompson C., Wilson L., Spithill T. W., Mitchell G. F. et al. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J. Immunol.* 1990. Vol. 145, No 11. P. 3905–3910.
- Sommer A., Nimtz M., Conradt H. S., Brattig N., Boettcher K., Fischer P., Walter R. D., Liebau E. Structural analysis and antibody response to the extracellular glutathione S-transferases from *Onchocerca volvulus*. *Infection and Immunity.* 2001. Vol. 69. P. 7718–7728.
- Sommer A., Rickert R., Fischer P., Steinhart H., Walter R. D., Liebau E. A dominant role for extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus*. Is the production of prostaglandin D₂. *Infection and Immunity.* 2003. Vol. 71. P. 3603–3606.
- Srinivasan L., Mathew M., Karunan T., Muthuswamy K. Biochemical studies on glutathione S-transferase from filarial worm *Setaria digitata*. *Parasitol. Res.* 2011. Vol. 109. P. 213–219. doi: 10.1007/s00436-010-2227-x.
- Taylor J. B., Vidal A., Torpier G., Meyer D. J., Roitsch C., Balloul J.-M., Southan C., Sondermeyer C., Pemble S., Lecocq J.-P., Capron A., Ketterer B. The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned M_r28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* 1988. Vol. 7. P. 465–472.
- Torres-Rivera A., Landa A. Glutathione transferases from parasites: a biochemical view. *Acta Tropica.* 2008. Vol. 105. P. 99–112.
- van Rossum A. J., Jefferies J. R., Rijsewijk F. A. M., LaCourse E. J., Teesdale-Spittle P., Barrett J., Tait A., Brophy P. M. Binding of hematin by a new class of glutathione transferase from the blood-feeding parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Infection and Immunity.* 2004. Vol. 72. P. 2780–2790.
- Vibanco-Perez N., Jimenez L., Merchant M. T., Landa A. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 1999. Vol. 85. P. 448–453.
- Vibanco-Perez N., Jimenez L., Mendoza-Hernandez G., Landa A. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitol. Res.* 2002. Vol. 88. P. 398–404.
- Walker J., Crowley P., Moreman A. D., Barrett J. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993. Vol. 61. P. 255–265.
- Wijffels G. L., Sexton J. L., Salvatore L., Pettitt J. M., Humphris D. C., Panaccio M., Spithill T. W. Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathione S-transferases of *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* 1992. Vol. 74. P. 87–99.

Zhan B., Liu S., Perally S., Xue J., Fujiwara R., Brophy P., Xiao S., Liu Y., Feng J., Williamson A., Wang Y., Bueno L. L., Mendez S., Goud G., Bethony J. M., Hawdon J. M., Loukas A., Jones K., Hotez P. J. Biochemical characterization and vaccine potential of a heme-binding glutathione transferase from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. *Infection and Immunity*. 2005. Vol. 73. P. 6903–6911.

Zhan B., Perally S., Brophy P. M., Xue J., Goud G., Liu S., Deumic V., de Oliveira L. M., Bethony J.,

Bottazzi M. E., Jiang D., Gillespie P., Xiao S-h., Gupta R., Loukas A., Ranjit N., Lustigman S., Oksov Y., Hotez P. Molecular cloning, biochemical characterization, and partial protective immunity of the heme-binding glutathione S-transferases from the human hookworm *Necator americanus*. *Infection and Immunity*. 2010. Vol. 78. P. 1552–1563. doi: 10.1128/IAI.00848–09. Epub 2010 Feb 9.

Received June 24, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Смирнов Лев Павлович

ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биохимии
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: levps@rambler.ru

Борвинская Екатерина Витальевна

научный сотрудник лаб. экологической биохимии
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: katsu@inbox.ru
тел.: (8142) 769810

Кочнева Альбина Александровна

студентка 4 курса эколога-биологического факультета
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: ko4neva93@yandex.ru

Суховская Ирина Викторовна

научный сотрудник лаборатории экологической биохимии
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: sukhovskaya@inbox.ru
тел.: 89052996049

CONTRIBUTORS:

Smirnov, Lev

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

Borvinskaya, Ekaterina

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

Koshneva, Al'bina

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ko4neva93@yandex.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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 591.1+591.5:599

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИОЛОГО- БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ГРЫЗУНОВ С РАЗЛИЧНОЙ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ СПЕЦИАЛИЗАЦИЕЙ

**Е. А. Хижкин¹, Е. П. Антонова¹, В. А. Илюха^{1,2}, Л. Б. Узенбаева¹,
Т. Н. Ильина¹, И. В. Баишникова¹, В. В. Белкин¹, Д. В. Шведов²**

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Петрозаводский государственный университет

Проведено сравнительное изучение возрастных изменений ряда физиолого-биохимических показателей у природно-адаптированных (ондатра) и не адаптированных (лабораторная крыса) к дефициту кислорода животных. Максимальные межвидовые различия ферментативного и неферментативного компонентов антиоксидантной системы (АОС) и уровня энергообеспечения отмечены в тканях сердца и почек. Направленность возрастных изменений различалась у исследуемых видов. АОС крыс в онтогенезе характеризовалась рассогласованием работы сопряженных антиоксидантных ферментов (АОФ) – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, а также компенсаторными изменениями уровня неферментативного антиоксиданта – витамина Е. У ондатры отмечалось выраженное повышение активности АОФ в сердце и почках – молодая ондатра (2–3 месяца) имела более низкую удельную активность СОД и каталазы, чем животные 5–6-месячного возраста. У последних активность АОФ достигала уровня, характерного для взрослых животных (12 и более месяцев). Были выявлены межвидовые различия клеточного состава крови. В ходе онтогенеза размеры эритроцитов и лейкоцитов у крыс увеличиваются, а у ондатры – уменьшаются, что, по нашему мнению, способствует улучшению реологических свойств крови и является приспособлением к полуводному образу жизни. У ондатры возрастные изменения изоферментного спектра лактатдегидрогеназы (ЛДГ), концентрации витамина Е в исследованных органах и лейкоформулы выражены слабее, чем у крыс.

Ключевые слова: ондатра; крыса; онтогенез; адаптация; антиоксидантные ферменты; лактатдегидрогеназа; витамин Е; лейкоциты; эритроциты.

**E. A. Khizhkin, E. P. Antonova, V. A. Ilyukha, L. B. Uzenbaeva, T. N. Ilyina,
I. V. Baishnikova, V. V. Belkin, D. V. Shvedov. AGE-RELATED CHANGES
OF PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RODENTS
WITH DIFFERENT ECOLOGICAL SPECIALIZATIONS**

We performed a comparative study of age-related changes in some physiological parameters of the muskrat, which can dive and is therefore well adapted to the lack of oxygen,

and in the non-diving laboratory rat. The analysis revealed considerable interspecies differences in the antioxidant systems and the energy supply levels in the heart and kidney tissues. Age-related variations of the studied values differed between the species. The results showed an imbalance in the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase, as well as a compensatory change in the level of such a non-enzymatic antioxidant as vitamin E in rats during aging. The muskrat demonstrated a marked age-related increase of the activity of antioxidant enzymes in heart and kidneys. A young second-generation muskrat had lower specific SOD and catalase activities compared to first-generation animals, which exhibited the same levels as adults. We identified interspecies differences in the differential blood leukocyte counts. During the ontogeny, the size of erythrocytes and leukocytes increased in rats, but decreased in muskrats, which appears to be necessary to improve the blood rheological properties and facilitate the adaptation to semi-aquatic lifestyle. Age-related changes in the tissue isozyme spectrum of lactate dehydrogenase, tissue concentration of vitamin E and in leukograms were less pronounced in muskrats compared to laboratory rats.

Key words: muskrat; rat; ontogeny; adaptation; antioxidant enzymes; lactate dehydrogenase; vitamin E; leukocytes; erythrocytes.

Введение

В процессе эволюции у млекопитающих, перешедших к полуводному образу жизни, сформировался ряд физиологических и биохимических механизмов, позволяющих амфибионтам противостоять дефициту кислорода в организме (гипоксия) при плавании под водой в течение продолжительного времени [Галанцев, 1977]. Недостаток кислорода способен приводить к продукции избытка кислородных радикалов, превышающего возможности антиоксидантной системы [Elsner et al., 1998; Gottlieb, 2003]. Стратегия защиты от окислительного стресса, связанного с гипоксией-реоксигенацией при нырянии, включает у вторичноводных млекопитающих повышение активности АОФ в тканях жизненно важных органов [Elsner et al., 1998; Коваленко, Молчанов, 2001]. Существует мнение, что антиоксидантные ферменты СОД и каталаза принимают участие не только в регуляции уровня свободнорадикального окисления, но и в поддержании аэробных процессов метаболизма во время задержек дыхания под водой [Галанцев и др., 1977], хотя такая возможность ставится под сомнение другими авторами [Иванов, 1993]. При этом необходимо учитывать и другие компенсаторные изменения функциональных систем, в частности, количественный состав и размерные характеристики лейкоцитов крови ныряющих животных, влияющих на ее реологические свойства, состав и количественную вариабельность изоферментов ЛДГ, обеспечивающих специфические для каждого вида животных и типа тканей обменные процессы.

Однако выявлению возрастных особенностей физиологических и метаболических

перестроек у полуводных млекопитающих уделяется крайне мало внимания. Особенности развития в ходе онтогенеза адаптивных механизмов, обеспечивающих животному продолжительное пребывание под водой, могут быть выявлены при сравнительном исследовании физиологической специфики у таксономически близких полуводных и наземных видов отряда Грызуны (*Rodentia*).

Целью настоящей работы было сравнительное изучение возрастных изменений физиолого-биохимических показателей у эволюционно адаптированных к дефициту кислорода ондатр (*Ondatra zibethicus* L.) и неадаптированных лабораторных крыс (*Rattus norvegicus* Berk.).

Материалы и методы

Самцы и самки крыс ($n = 10$) содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении Карелии. Выборка включала по пять животных в возрасте 6 и 18 месяцев (осенний период). Самцы и самки ондатр ($n = 24$) были отловлены 15–17 октября 2011 г. на оз. Миккельское в окрестностях п. Эссойла (Карелия). Выборка состояла из животных первой генерации, рожденных в конце весны 2011 года ($n = 11$; возраст 5–6 месяцев), второй генерации, рожденных летом 2011 года ($n = 1$; возраст 2–3 месяца), и взрослых животных ($n = 12$; возраст более 12 месяцев).

Использовали ткани сердца, испытывающего значительную по сравнению с другими органами функциональную нагрузку при нырянии [Шмидт-Ниельсен, 1982; Hochachka, Somero, 2002], и почек, как органа, секретирующего эритропоэтин, который стимулирует эритропоэз [Козинец и др., 2001].

Образцы тканей животных отбирали после декапитации, замораживали и хранили до проведения анализа при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Гомогенаты тканей (навеска 80–90 мг) готовили в 2 мл 0,05 М фосфатного буферного раствора ($\text{pH} = 7,0$), после чего центрифугировали при 6000 g в течение 15 мин и в супернатанте определяли активность СОД по модифицированной адренохромной методике [Misra, Fridovich, 1972], а каталазы – по количеству разложенной H_2O_2 [Bears, Sizer, 1952]. За одну условную единицу активности СОД принимали 50-процентное торможение автоокисления адреналина в адренохром. Активность каталазы выражали в количестве H_2O_2 , разложенной за одну минуту. Содержание белка определяли по методу Лоури [Lowry et al., 1951]. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин. Активность ферментов рассчитывали на 1 г сырой ткани и 1 мг белка. Концентрацию витамина Е определяли методом ВЭЖХ [Скурихин, Двинская, 1989]. Разделение изоферментов лактатдегидрогеназы осуществляли методом горизонтального электрофореза на пластинках агарового геля с последующим окрашиванием [Райдер, Тейлор, 1983]. После сканирования электрофореграмм содержание каждого изофермента выражали в процентах от общей ферментативной активности. Для микроскопического исследования крови на предварительно обезжиренных предметных стеклах готовили мазки по общепринятой методике. Лейкоцитарную формулу крови подсчитывали общепринятым способом [Справочник..., 1975], размеры лимфоцитов и эритроцитов – с использованием компьютерной системы анализа изображений «Видеотест».

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики, сравнение проводили с применением непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни, степень различий между изученными группами оценивали с помощью кластерного анализа [Коровов, Горбач, 2007].

Исследования выполнены на научном оборудовании ЦКП НО Института биологии КарНЦ РАН 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

Обнаружено, что в сердце у взрослых крыс происходило снижение активности СОД и повышение – каталазы. В почках у взрослых особей активность СОД не изменялась, тогда как активность каталазы была достоверно выше по сравнению с 6-месячными животными (табл. 1).

Выявленное нами увеличение активности каталазы является следствием усиленного образования перекиси водорода, источниками которого в организме помимо реакции дисмутации супероксид-иона, катализируемого СОД, являются реакции, катализируемые различными оксидазами [Меньщикова и др., 2006]. Известно, что большие концентрации H_2O_2 способны ингибировать каталитическую активность СОД и в некоторых случаях приводить к взаимодействию данного фермента с H_2O_2 , инициируя образование радикалов O_2^- и $\cdot\text{OH}$

Таблица 1. Активность АОФ и концентрация витамина Е в органах у крыс и ондатр разных возрастов

	Крысы		Juv	Ондатры	
	Ad1	Ad2		Ad1	Ad2
Сердце					
СОД (усл. ед./мг белка)	2,01 ± 0,58	1,01 ± 0,24	2,58	4,06 ± 0,28♠	3,85 ± 0,17♦
Каталаза (мкМ H_2O_2 /мин/мг белка)	0,39 ± 0,023	0,65 ± 0,16	0,90	1,19 ± 0,09♠	1,21 ± 0,06♦
Витамин Е (усл. ед./мг ткани)	12,42 ± 1,86	30,80 ± 8,66*	3,62	7,75 ± 0,64♠	8,87 ± 0,40♦
Почки					
СОД (усл. ед./мг белка)	1,81 ± 0,38	1,70 ± 0,28	3,82	3,93 ± 0,28♠	4,32 ± 0,38♦
Каталаза (мкМ H_2O_2 /мин/мг белка)	1,11 ± 0,15	2,00 ± 0,19*	1,65	2,12 ± 0,24♠	2,12 ± 0,15
Витамин Е (усл. ед./мг ткани)	15,16 ± 1,89	7,70 ± 2,00*	4,58	4,07 ± 0,33♠	4,89 ± 0,23

Примечание. Здесь и на рис. 1: Juv – ондатра второй генерации (2–3 месяца), Ad1 – молодые животные (5–6 месяцев), Ad2 – взрослые животные (>12 месяцев); * – различия достоверны по сравнению с молодыми животными у одного вида, ♠ – межвидовые различия у молодых животных достоверны, ♦ – межвидовые различия у взрослых животных достоверны.

[Зенков и др., 2001]. Генерация избытка активных форм кислорода, на наш взгляд, может являться причиной повышения уровня витамина E в сердце у взрослых крыс по сравнению с молодыми (см. табл. 1). Увеличение концентрации токоферола в этом органе при рассогласовании работы сопряженных АОФ выступает в качестве защитного механизма от индуцируемого гидроксильным радикалом перекисного окисления липидов. Изменение концентрации витамина E в органах возможно либо при поступлении его извне, либо за счет перераспределения между органами. Вероятно, увеличение уровня токоферола в сердце у взрослых крыс обусловлено снижением его концентрации в почках у этих животных (см. табл. 1).

В сердце и в почках у ондатр отмечена тенденция повышения удельной активности АОФ в первые 6 месяцев развития животных. У молодых ондатр (2–3 месяца) активность и СОД, и каталазы была ниже, чем у 5–6-месячных животных. При этом активность ферментов АОС у последних уже достигала уровня, характерного для взрослых животных (см. табл. 1). В ходе индивидуального развития изменений концентрации витамина E ни в сердце, ни в почках ондатр выявлено не было. Следует отметить, что в каждом отдельном возрастном периоде уровень активности исследованных ферментов в органах был выше, а концентрация витаминов ниже у ондатр, испытывающих периодическую кратковременную гипоксию. Вероятно, у этих животных главная роль в защите от усиленного образования АФК принадлежит ферментам АОС, а не низкомолекулярным антиоксидантам.

Количественную вариабельность компонентов изоферментного спектра ЛДГ можно рассматривать как внутриклеточную специализацию биохимических функций, направленную на обеспечение максимальной адаптации животных к условиям окружающей среды [Ночаська, Somero, 2002]. В сердце и почках у крыс обеих возрастных групп соотношение фракций характеризовалось высоким содержанием ЛДГ1 и ЛДГ2 и малым количеством ЛДГ4 и ЛДГ5. При этом в сердечной мышце у взрослых животных, по сравнению с 6-месячными, было выявлено усиление синтеза изофермента ЛДГ2 (рис. 1). Такое соотношение фракций ЛДГ свидетельствует о преобладании преобразования лактата в пируват, который может служить источником для поддержания аэробного типа обмена на высоком уровне в сердце взрослых животных. Описанные метаболические сдвиги могут сопровождаться усилением генерации АФК, что, наряду со снижением активности СОД

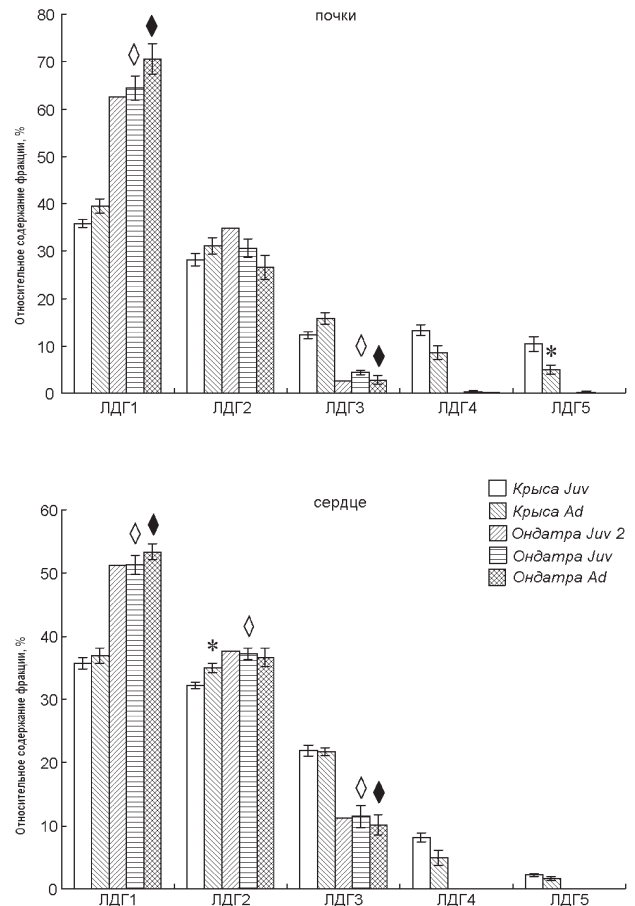


Рис. 1. Изоферментный спектр ЛДГ в органах у крыс и ондатр разных возрастов

в этом органе у взрослых крыс, может приводить к повреждению кардиомиоцитов.

В почках и в сердце ондатр, по сравнению с не адаптированными к периодической гипоксии крысами, отмечено более высокое содержание фракции ЛДГ1 и небольшое количество остальных фракций (см. рис. 1). При этом в сердце у полуводных животных изоферменты ЛДГ4 и ЛДГ5 вовсе отсутствовали. Значительных возрастных изменений изоферментного спектра ЛДГ в исследованных органах у ондатр выявлено не было, однако отмечено некоторое повышение содержания ЛДГ1 и в почках и в сердце у взрослых животных.

В результате кластерного анализа исследованных показателей выделено две группы (рис. 2): в одну из них вошли ондатры разных возрастов (вид, испытывающий функциональную нагрузку на организм, связанную с дефицитом кислорода при нырянии), в другую – не адаптированные к кратковременной гипоксии крысы. Межвидовые различия по изученным показателям были почти в два раза выше, чем внутригрупповые (возрастные между молодыми и взрослыми животными). Учитывая онтогенетические изменения АОС и ЛДГ, можно



Рис. 2. Дендрограмма сходства разных возрастных групп двух видов по показателям активности АОФ, концентрации витамина Е и изоферментному спектру ЛДГ в почках и сердце

заключить, что у молодых ондатр (2–3 месяца) происходит процесс становления этих систем, который завершается уже к 5–6-му месяцу развития.

Наряду с приспособительным перераспределением кровотока [Галанцев, 1977], адаптация к нырянию у околотовных млекопитающих связана также с изменениями клеточного состава крови. В нашем исследовании у ондатр, независимо от их возраста, в крови было выявлено преобладание нейтрофилов, среди которых максимальный уровень отмечен для сегментоядерных клеток (табл. 2). Сходное количественное соотношение лейкоцитов у животных, природно-адаптированных к гипоксии, было выявлено в исследованиях В. П. Галанцева и коллег [1993, 1994]. Показано, что повышение уровня нейтрофилов у ондатр является компенсаторной реакцией этих животных на ныряние ввиду наличия высокой прооксидантной активности миелопероксидазы в клетках

этого типа. Напротив, у крыс лейкоцитарная формула имела лимфоидный профиль (см. табл. 2). Следует отметить, что у крыс в возрасте 6 и 18 месяцев поддерживается характерный для них физиологический уровень лимфоцитов ($76,00 \pm 2,17\%$ и $76,60 \pm 2,04\%$ соответственно) и сегментоядерных нейтрофилов ($17,60 \pm 2,11\%$ и $10,60 \pm 0,75\%$ соответственно). При этом у взрослых животных, по сравнению с молодыми, в клеточном составе крови выявлено уменьшение содержания сегментоядерных и возрастание уровня палочкоядерных нейтрофилов. Также в крови у взрослых крыс были обнаружены естественные киллеры, проявляющие цитотоксические свойства в отношении ряда клеток-мишеней – большие гранулярные лимфоциты (см. табл. 2).

Размеры лимфоцитов и эритроцитов имели межвидовые различия. Так, площадь лейкоцитов у молодых ондатр выше, а у взрослых

Таблица 2. Лейкоцитарная формула крыс и ондатр

	Крысы		Ондатры	
	Ad1	Ad2	Ad1	Ad2
Моноциты	$2,60 \pm 0,76$	$5,00 \pm 0,87$	$5,50 \pm 0,97\phi$	$5,67 \pm 1,44$
Лимфоциты	$76,00 \pm 2,42$	$76,60 \pm 2,28$	$30,83 \pm 5,89\phi$	$31,33 \pm 7,17\phi$
Палочкоядерные нейтрофилы	$0,40 \pm 0,27$	$4,40 \pm 1,10^*$	$14,33 \pm 3,75\phi$	$15,44 \pm 2,83\phi$
Сегментоядерные нейтрофилы	$17,60 \pm 2,36$	$10,60 \pm 0,84^*$	$47,50 \pm 5,53\phi$	$46,11 \pm 6,19\phi$
Эозинофилы	$3,40 \pm 1,10$	$3,20 \pm 1,08$	$1,50 \pm 1,05$	$1,33 \pm 0,85$
Базофилы	0	$0,20 \pm 0,22$	0	$0,11 \pm 0,12$
Большие гранулярные лимфоциты	0	$3,40 \pm 1,60$	$0,33 \pm 0,37$	0

Примечание. Здесь и на рис. 3, 4: Ad1 – молодые животные (5–6 месяцев), Ad2 – взрослые животные (>12 месяцев); * – различия достоверны по сравнению с молодыми животными, ϕ – различия достоверны между видами

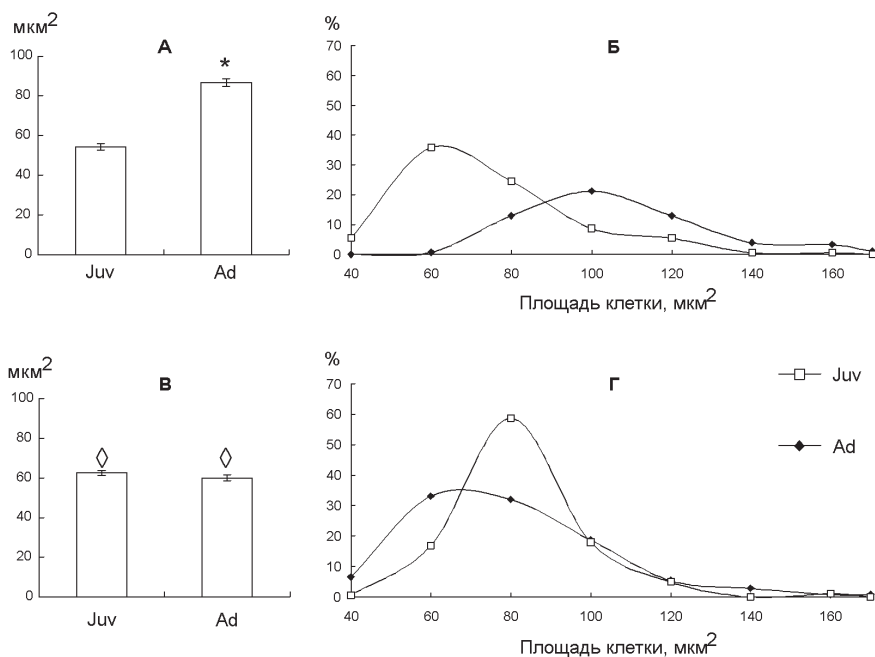


Рис. 3. Размеры лимфоцитов в периферической крови крыс (А, Б) и ондатр (В, Г) разного возраста

ниже, чем у крыс соответствующих возрастов (рис. 3). В ходе онтогенеза у ондатр площадь лимфоцитов не изменялась. При этом если у молодых ондатр преобладали клетки больших размеров (70–90 мкм²), то у взрослых животных – маленькие лимфоциты (50–80 мкм²). Размеры клеток красной крови ондатр обеих возрастных групп были значительно больше по сравнению с не адаптированными к нырянию крысами (рис. 4). В постнатальном онтогенезе у ондатр площадь эритроцитов уменьшалась.

Молодые особи имели клетки несколько больших размеров (45–55 мкм²) по сравнению со взрослыми животными (35–45 мкм²). В отличие от ондатр у крыс при старении наблюдалось увеличение размеров исследованных клеток крови, а также количества больших клеток у взрослых животных (см. рис. 3 и 4). Важной особенностью клеток крови у ондатр, как у полуводного вида, по нашему мнению, является преобладание у взрослых животных лимфоцитов и эритроцитов небольших размеров, тогда

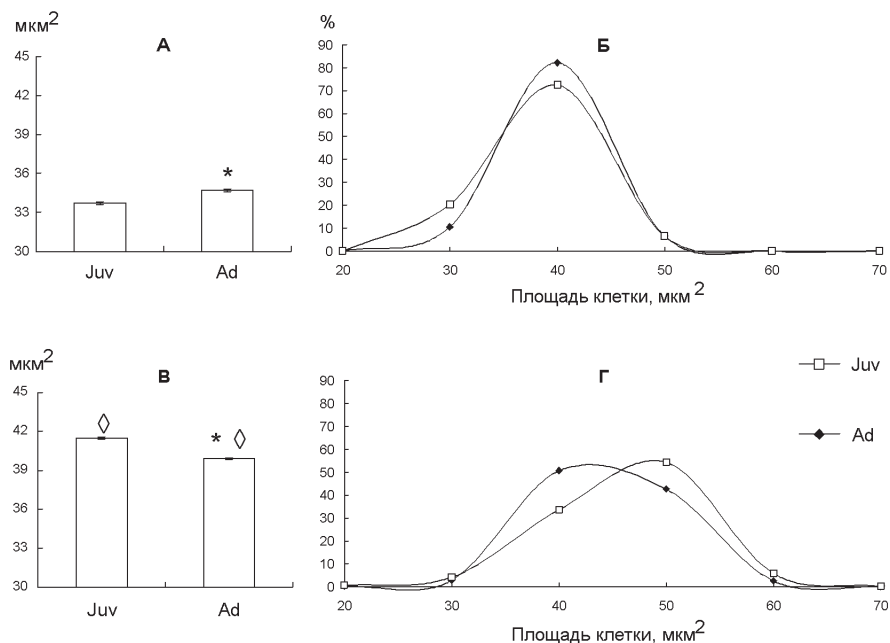


Рис. 4. Размеры эритроцитов периферической крови крыс (А, Б) и ондатр (В, Г) разного возраста

как у крыс такие клетки характерны для молодых животных.

Сравнительный анализ возрастных изменений физиологических показателей у млекопитающих с различной экологической специализацией позволил выявить ряд особенностей, присущих природно-адаптированной к кратковременной гипоксии ондатре. Установлено, что у ондатры второй генерации (2–3 месяца) активность исследованных ферментов АОС и содержание изофермента ЛДГ1 в сердце и в почках были несколько ниже по сравнению с более взрослыми животными. Однако уже у ондатр 5–6 месяцев не выявлено различий со взрослыми особями по этим показателям. При этом как у молодых, так и у взрослых ондатр активность АОФ и уровень ЛДГ1 в обоих органах были значительно выше, чем у не адаптированных к гипоксии крыс соответствующих возрастов. Необходимо отметить, что максимальная продолжительность ныряния у крыс составляет всего 2 минуты, что значительно меньше 12 минут, зарегистрированных для ондатр [Irving, 1939]. В отличие от последних у крыс выявленные возрастные изменения АОС и изоферментного спектра ЛДГ свидетельствуют о «старении» этих физиологических систем.

По мнению Р. А. МакАртура с соавторами, длительность погружений ондатр существенно не увеличивается с возрастом, и одно-двухмесячные молодые ондатры имеют схожую со взрослыми продолжительность ныряния [MacArthur et al., 2001]. Однако другими исследователями [Hindle et al., 2006] было выявлено, что способность ондатр к длительным погружениям с возрастом усиливается – молодые ондатры второй генерации значительно меньше находятся под водой, чем животные первой генерации и взрослые особи. Молодые ондатры более зависимы от анаэробного метаболизма, и при нырянии у них наблюдается большее количество коротких погружений, чем у взрослых. Кроме того, молодые особи отличаются более низким уровнем различных показателей, обеспечивающих высокую интенсивность аэробного метаболизма (уровень гемоглобина, насыщение крови кислородом, гематокрит, общий легочный объем, концентрация миоглобина в скелетной мускулатуре, тканевый уровень кислорода) [MacArthur et al., 2001, 2003]. Возрастные изменения всех этих физиологических параметров, а также выявленные нами онтогенетические особенности становления АОС и изоферментного спектра ЛДГ, по нашему мнению, связаны с продолжительностью ныряния, и их можно рассматривать как адаптивный механизм, обеспечивающий увеличение

длительности пребывания ондатр под водой с возрастом.

Реакция крыс и ондатр на кратковременное гипоксическое воздействие имеет ряд принципиальных отличий. Так, было установлено [Martin et al., 2002], что в почках у крыс, содержащихся при пониженной концентрации O_2 (5–6 %) в течение 25 минут, наряду с повышением активности СОД усиливается экспрессия генов, кодирующих антиоксидантные ферменты – цитоплазматической СОД, каталазы и глутатионредуктазы. В исследовании В. П. Галанцева с коллегами [Галанцев и др., 1994] отмечается, что перекисное окисление липидов в сердце у крыс имеет тенденцию к усилению при брадикардии, вызванной задержкой дыхания, а у ондатр, напротив, уменьшается на 30 %, активность каталазы при этом у последних увеличивается почти в 2 раза. Авторы считают, что такие изменения могут являться механизмом, обеспечивающим защиту от свободнорадикальных повреждений. В результате у адаптированных к водному образу жизни млекопитающих тканевая гипоксия развивается в более поздние сроки, чем у неадаптированных видов. В отличие от крыс, у ондатр при задержке дыхания в ткани сердца увеличивается содержание как лактата, так и пирувата, соотношение лактат/пируват при этом не изменяется. Это свидетельствует об активации в сердце у природно-адаптированных к гипоксии животных различных как анаэробных, так и аэробных путей получения энергии [Галанцев и др., 1994].

Однако изучение соотношения изоферментов ЛДГ в сердце ондатр позволяет нам несколько скорректировать это утверждение. Высокое содержание ЛДГ1 и отсутствие фракций ЛДГ4 и ЛДГ5 может являться причиной обнаруженного авторами [Галанцев и др., 1994] повышения уровня пирувата в сердечной мышце. Следует также учитывать, что предпочтительным субстратом для работы сердца является не глюкоза, а молочная кислота, приносимая кровью от других органов. Можно предположить, что усиленное образование пировиноградной кислоты приводит к возрастанию использования ныряющими млекопитающими аэробных биоэнергетических механизмов.

Увеличение активности каталазы при гипоксии в сердечной мышце может быть связано с важной сигнальной ролью перекиси водорода в кровеносной системе. Существует доказательство того, что млекопитающие обладают как минимум двумя H_2O_2 -сенсорами, один из которых находится в нейроэпителиальных тельцах легкого и отвечает за сужение или

расширение дыхательных путей, а другой выполняет ту же функцию применительно к кровеносным сосудам, находясь в клетках каротидного синуса [Wang et al., 1996; Скулачев, 2001]. Следует отметить, что сигнал на сужение дыхательных путей и сосудов возникает при повышении концентрации H_2O_2 независимо от причины, вызвавшей данное повышение. К этому может приводить не только рост концентрации O_2 в крови из-за уменьшения потребления кислорода тканями, но и активация продукции H_2O_2 или торможение ее расщепления [Скулачев, 2001]. Возможно, именно для быстрого удаления перекиси водорода, которая в данном случае выступает как сигнальная молекула, и необходима столь высокая активность каталазы в сердце. Исходя из этого, можно утверждать, что более высокая активность каталазы и низкий уровень ПОЛ у ондатр по сравнению с крысами является адаптацией к нырянию.

Известно, что в общем комплексе физиологических адаптаций к гипоксии важную роль имеют приспособительные сердечно-сосудистые реакции, проявляющиеся в изменении биоэлектрической активности сердца и морфологии кровеносного русла (централизация кровотока и вазоконстрикция на периферии). Наряду с этим адаптация к нырянию у полуводных животных связана с изменением клеточного состава крови [Галанцев и др., 1994]. Сравнительный анализ возрастных изменений лейкоцитарной формулы крови у неадаптированных и адаптированных к гипоксии животных показал, что как молодые, так и взрослые ондатры характеризовались более высоким содержанием сегментоядерных и палочкоядерных нейтрофилов и низким числом лимфоцитов по сравнению с крысами. Немаловажным является и то, что у взрослых ондатр в крови преобладают более мелкие клетки. Очевидно, что выявленное нами уменьшение с возрастом размеров клеток крови у испытывающих периодическую гипоксию ондатр необходимо для улучшения реологических свойств крови и также является приспособлением к полуводному образу жизни.

Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что все выявленные у ондатры возрастные изменения адаптивных признаков служат для увеличения продолжительности ныряния. При этом повышение с возрастом активности СОД и особенно каталазы в сердце и почках необходимо рассматривать как механизм, обеспечивающий посредством

H_2O_2 -сенсоров регуляцию состояния кровеносных сосудов в этих органах для перераспределения кровотока при погружении под воду и всплытии. Увеличение относительного содержания ЛДГ1 в изоферментном спектре у взрослых животных свидетельствует об усилении аэробных биоэнергетических процессов – лактат является более предпочтительным субстратом по сравнению с глюкозой для изученных органов, а его превращение в пируват, катализируемое изоферментом ЛДГ1, приводит к более эффективному получению энергии. Кроме этого, пируват наряду с каталазой может выполнять защитную функцию по предотвращению автоокисления кислородсвязывающих белков в организме [Olek et al., 2005]. Изменение клеточного состава лейкоцитов и уменьшение размеров эритроцитов и лейкоцитов в онтогенезе направлено на оптимизацию реологических свойств крови и обеспечение периферических тканей кислородом при сужении кровеносных сосудов во время ныряния.

У крыс наблюдаемые онтогенетические изменения физиологических систем связаны преимущественно с поддержанием гомеостаза исследованных органов и организма в целом у стареющих и старых животных, а их направленность отличается от таковой, наблюдаемой у ондатр.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента НШ-1410.2014.4, средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (темы № 50.1, № г. р. 01201358732) и программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

Авторы выражают признательность сотрудникам лаборатории зоологии ИБ КарНЦ РАН К. Ф. Тирронену и Д. В. Панченко, а также студентам ПетрГУ В. Л. Ульякову и С. И. Блинову за помощь в отлове животных в природе.

Литература

Галанцев В. П. Эволюция адаптаций ныряющих животных. Эколого- и морфофизиологические аспекты. Л.: Наука, 1977. 191 с.

Галанцев В. П., Коваленко С. Г., Гуляева Е. П. и др. Особенности метаболизма у водных и полуводных млекопитающих при асфиксии // Вестник Санкт-Петербургского университета. 1993. Сер. 3, вып. 1, № 3. С. 73–80.

Галанцев В. П., Камардина Т. А., Коваленко Р. И. Реакции сердечно-сосудистой системы и биоэнергетический метаболизм в связи с адаптацией

к апноэ // Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 1994. Т. 80, № 9. С. 117–123.

Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК; Наука; Интерпериодика, 2001. 343 с.

Иванов К. П. Основы энергетики организма: теоретические и практические аспекты. Т. 2. Биологическое окисление и его обеспечение кислородом. СПб.: Наука, 1993. 272 с.

Коваленко Р. И., Молчанов А. А. Биохимические механизмы адаптации вторичноводных амниот // Нервная система. 2001. Вып. 34. С. 154–193.

Козинец Г. И., Высоцкий В. В., Погорелов В. М. и др. Кровь и инфекция. М.: Триада-фарм, 2001. 456 с.

Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных: методическое пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, 2007. 76 с.

Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.

Райдер К., Тейлор К. Изоферменты. М.: Мир, 1983. 197 с.

Скулачев В. П. H₂O₂-сенсоры легких и кровеносных сосудов и их роль в антиоксидантной защите организма // Биохимия. 2001. Т. 66, № 10. С. 1425–1429.

Скурихин В. Н., Двинская Л. М. Определение α-токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии // Сельскохозяйственная биология. 1989. № 4. С. 127–129.

Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. Е. А. Кост. М.: Наука, 1975. 583 с.

Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда. Книга 1 / Пер. с англ. М. Д. Гроздовой, Г. И. Рожковой; под ред. и с предисл. Е. М. Крепса. М.: Мир, 1982. 416 с.

Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации / Под ред. Ю. Б. Белоусова. М.: Об-во клин. исслед., 2005. 156 с.

Bears R. F., Sizer I. N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. 1952. Vol. 195, No 1. P. 133–140.

Elsner R., Oyaseter S., Almaas R., Saugstad O. D. Diving seals, ischemia-reperfusion and oxygen

radicals // Comp. Biochem. Physiol. 1998. Vol. 119A, No 4. P. 975–998. doi: 10.1016/S1095-6433(98)00012-9.

Gottlieb R. A. Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart // Basic Res. Cardiol. 2003. Vol. 98, No 4. P. 242–249. doi: 10.1007/s00395-003-0404-0.

Hindle A. G., Senkiw R. W., MacArthur R. A. Body cooling and the diving capabilities of muskrats (*Ondatra zibethicus*): A test of the adaptive hypothermia hypothesis // Comp. Biochem. Physiol. 2006. Vol. 144A. P. 232–241. doi:10.1016/j.cbpa.2006.03.001.

Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical adaptation: mechanisms and process in physiological evolution. N. Y.: Oxford University Press, 2002. 466 p.

Irving L. Respiration in diving mammals // Physiol. Rev. 19, 1939. P. 112–134.

Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, No 1. P. 265–275.

MacArthur R. A., Humphries M. M., Fines G. A., Campbell K. L. Body oxygen stores, aerobic dive limits, and the diving abilities of juvenile and adult muskrats (*Ondatra zibethicus*) // Physiol. Biochem. Zool. 2001. Vol. 74. P. 178–190.

MacArthur R. A., Weseen G. L., Campbell K. L. Diving experience and the aerobic dive capacity of muskrats: does training produce a better diver? // J. Exp. Biol. 2003. Vol. 206. P. 1153–1161. doi:10.1242/jeb.00221.

Martin R., Fitzl G., Mozet C. et al. Effect of age and hypoxia/reoxygenation on mRNA expression of antioxidative enzymes in rat liver and kidneys // Exp. Gerontology. 2002. Vol. 37. P. 1479–1485. doi: 10.1016/S0531-5565(02)00168-7.

Misra H. H., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase // J. Biol. Chem. 1972. Vol. 247. P. 3170–3175.

Olek R. A., Antosiewicz J., Popinigis J. et al. Pyruvate but not lactate prevents NADH-induced myoglobin oxidation // Free Radical Biology & Medicine. 2005. Vol. 38. P. 1484–1490.

Wang D., Youngson C., Wong V. et al. NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K⁺ channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 13182–13187.

Поступила в редакцию 10.03.2015

References

Galantsev V. P. Jevoljucija adaptacij nyrjajushhих zhi-votnyh. Jekologo- i morfofiziolicheskie aspekty [The evolution of adaptations of the diving animal. Ecological and morphophysiological aspects]. Leningrad: Nauka, 1977. 191 p.

Galantsev V. P., Kovalenko S. G., Gulyaeva E. P., Kamardina T. A., Kovalenko R. I., Kuz'min D. A., Molchanov A. A. Osobennosti metabolizma u vodnykh i poluvodnykh

mlekoopitayushchikh pri asfiksii [Some peculiarities of metabolism in aquatic and semiaquatic mammals under asphyxia]. Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta [Vestnik of St. Petersburg Univ.] 1993. Ser. 3, iss. 1, No 3. P. 73–80.

Galantsev V. P., Kamardina T. A., Kovalenko R. I. Reakcii serdechno-sosudistoj sistem i bioenergeticheskij metabolizm v svjazi s adaptaciej k apnoje [Cardiovascular

system reactions and bioenergy metabolism in relation to adaptation to apnea]. *Fiziol. zhurn. im. I. M. Sechenova* [I. M. Sechenov Physiological Journal]. 1994. Vol. 80, No 9. P. 117–123.

Ivanov K. P. Osnovy jenergetiki organizma: teoreticheskie i prakticheskie aspekty. T. 2. Biologicheskoe okislenie i ego obespechenie kislorodom [The principles of energetics in organisms: theoretical and practical aspects. Vol. 2. Biological oxidation and oxygen supply]. St. Petersburg: Nauka, 1993. 272 p.

Jeticheskaja jekspertiza biomedicinskih issledovanij. Prakticheskie rekomendacii [Ethical review of biomedical research. Best practices]. Ed. Ju. B. Belousova. Moscow: Ob-vo klin. issled., 2005. 156 p.

Kovalenko R. I., Molchanov A. A. Biohimicheskie mehanizmy adaptacii vtorichnovodnyh amniot [Biochemical mechanisms of adaptation of the secondary aquatic amniotes]. *Nervnaja sistema* [Nervous system]. 2001. Iss. 34. P. 154–193.

Kozinec G. I., Vysockij V. V., Pogorelov V. M., Erovičenkova A. A., Malov V. A. Krov' i infekcija [Blood and infection]. Moscow: Triada-farm, 2001. 456 p.

Korosov A. V., Gorbach V. V. Komp'juternaja obrabotka biologicheskikh dannyh: metodicheskoe posobie [Computer-aided processing of biological data: manual]. Petrozavodsk: PetrGU, 2007. 76 p.

Men'shchikova E. B., Lankin V. Z., Zenkov N. K., Bondar' I. A., Krugovyh N. F., Trufakin V. A. Okislitel'nyj stress. Prooksidanty i antioksidanty [Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants]. Moscow: Slovo, 2006. 556 p.

Rajder K., Tejlor K. Izofermenty [Isozymes]. Moscow: Mir, 1983. 197 p.

Shmidt-Niel'sen K. Fiziologiya zhivotnykh. Prispoblenie i sreda. Kn. 1 [Animal physiology. Adaptation and environment. Book 1]. Transl. from Engl. M. D. Grozdova, G. I. Rozhkovoi; ed., foreword by E. M. Krepsa. Moscow: Mir, 1982. 416 p.

Skulachev V. P. H₂O₂-sensory legkih i krovenosnyh sosudov i ih rol' v antioksidantnoj zashhite organizma [H₂O₂ sensors of lungs and blood vessels and their role in the antioxidant defense of the body]. *Biohimija* [Biochemistry]. 2001. Vol. 66, No 10. P. 1425–1429.

Skurihin V. N., Dvinskaja L. M. Opredelenie α -tokoferola i retinola v plazme krovi sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh metodom mikrokolonochnoj vysokojeffektivnoj zhidkostnoj hromatografii [Measuring α -tocopherol and retinol in blood plasma of farm animals using microcolumn high performance liquid chromatography]. *Sel'skohozjajstvennaja biologija* [Agricultural Biology]. 1989. No 4. P. 127–129.

Spravochnik po klinicheskim laboratornym metodam issledovanija [Handbook of clinical laboratory methods of research]. Ed. E. A. Kost. Moscow: Nauka, 1975. 583 p.

Zenzov N. K., Lankin V. Z., Men'shchikova E. B. Okislitel'nyj stress: Biohimicheskij i patofiziolicheskij aspekty [Oxidative stress: biochemical and

pathophysiological aspects]. Moscow: MAIK; Nauka; Interperiodika, 2001. 343 p.

Bears R. F., Sizer I. N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 1952. Vol. 195, No 1. P. 133–140.

Elsner R., Oyaseter S., Almaas R., Saugstad O. D. Diving seals, ischemia-reperfusion and oxygen radicals. *Comp. Biochem. Physiol.* 1998. Vol. 119A, No 4. P. 975–998. doi:10.1016/S1095-6433(98)00012-9.

Gottlieb R. A. Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart. *Basic Res. Cardiol.* 2003. Vol. 98, No 4. P. 242–249. doi: 10.1007/s00395-003-0404-0.

Hindle A. G., Senkiw R. W., MacArthur R. A. Body cooling and the diving capabilities of muskrats (*Ondatra zibethicus*): A test of the adaptive hypothermia hypothesis. *Comp. Biochem. Physiol.* 2006. Vol. 144A. P. 232–241. doi:10.1016/j.cbpa.2006.03.001.

Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical adaptation: mechanisms and process in physiological evolution. N. Y.: Oxford University Press, 2002. 466 p.

Irving L. Respiration in diving mammals. *Physiol. Rev.* 19, 1939. 112–134.

Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, No 1. P. 265–275.

MacArthur R. A., Humphries M. M., Fines G. A., Campbell K. L. Body oxygen stores, aerobic dive limits, and the diving abilities of juvenile and adult muskrats (*Ondatra zibethicus*). *Physiol. Biochem. Zool.* 2001. Vol. 74. P. 178–190.

MacArthur R. A., Weseen G. L., Campbell K. L. Diving experience and the aerobic dive capacity of muskrats: does training produce a better diver? *J. Exp. Biol.* 2003. Vol. 206. P. 1153–1161. doi:10.1242/jeb.00221.

Martin R., Fitzl G., Mozet C., Martin H., Welt K., Wieland E. Effect of age and hypoxia/reoxygenation on mRNA expression of antioxidative enzymes in rat liver and kidneys. *Exp. Gerontology.* 2002. Vol. 37. P. 1479–1485. doi:10.1016/S0531-5565(02)00168-7.

Misra H. H., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972. Vol. 247. P. 3170–3175.

Olek R. A., Antosiewicz J., Popinigis J., Gabbianelli R., Fedeli D., Falcioni G. Pyruvate but not lactate prevents NADH-induced myoglobin oxidation. *Free Radical Biology & Medicine.* 2005. Vol. 38. P. 1484–1490.

Wang D., Youngson C., Wong V., Yeger H., Dinanuer M. C., Vega-Saenz de Miera E., Rudy B., Cutz E. NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K⁺ channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93. P. 13182–13187.

Received March 10, 2015

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

Антонова Екатерина Петровна

младший научный сотрудник
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: antoonkina@rambler.ru

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
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ilyukha@bio.krc.karelia.ru

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

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

Баишникова Ирина Валерьевна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: iravbai@mail.ru

Белкин Владимир Васильевич

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: vladimir-belkin@inbox.ru

Шведов Дмитрий Владимирович

Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
студент эколого-биологического факультета
эл. почта: sawa-wv2@yandex.ru

CONTRIBUTORS:

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

Antonova, Ekaterina

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

Ilyukha, Viktor

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian
Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ilyukha@bio.krc.karelia.ru

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

Ilyina, Tatyana

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian
Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ilyina@bio.krc.karelia.ru

Baishnikova, Irina

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

Belkin, Vladimir

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian
Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: vladimir-belkin@inbox.ru

Shvedov, Dmitry

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: sawa-wv2@yandex.ru

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ ОГУРЦА

А. А. Фенько, Н. С. Репкина, В. В. Таланова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучено влияние фитогормона салициловой кислоты (СК) на устойчивость проростков огурца (*Cucumis sativus* L.) к действию низкой закалывающей (12 °С) и повреждающей (4 °С) температуры. Выявлено, что воздействие температуры 12 °С на не обработанные СК проростки способствует их закаливанию, о чем свидетельствует уменьшение выхода электролитов из семядольных листьев. В отличие от этого, температура 4 °С оказывала на проростки, не обработанные СК, повреждающий эффект, приводя к увеличению выхода электролитов. Установлено также, что при воздействии температуры 12 °С на не обработанные СК растения происходило снижение содержания в листьях конечного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА) и свободного пролина, а при действии температуры 4 °С – их накопление. Предобработка СК в концентрациях 50 и 100 мкМ снижала выход электролитов из клеток листьев огурца при действии температуры как 12, так и 4 °С. Кроме того, экзогенная СК и при обычной температуре (22 °С), и в условиях низкой закалывающей (12 °С) и повреждающей (4 °С) температуры снижала ПОЛ, приводя к уменьшению уровня МДА, а также способствовала накоплению в семядольных листьях свободного пролина. Полученные данные свидетельствуют о способности СК активизировать процессы, направленные на повышение холодоустойчивости растений огурца.

Ключевые слова: *Cucumis sativus* L.; низкая закалывающая и повреждающая температура; салициловая кислота; холодоустойчивость.

A. A. Fenko, N. S. Repkina, V. V. Talanova. SALICYLIC ACID EFFECT ON THE COLD TOLERANCE OF CUCUMBER SEEDLINGS

The effect of the phytohormone salicylic acid (SA) on the resistance of cucumber seedlings (*Cucumis sativus* L.) to the action of a low hardening (12 °C) and a damaging (4 °C) temperatures was investigated. It was found that the exposure of the seedlings not treated with SA to 12 °C temperature promotes their hardening, as evidenced by reduced electrolyte leakage from cotyledons. In contrast, the 4 °C temperature had a damaging effect on the seedlings not treated with SA, resulting in an increase of electrolyte leakage. It was found also that the content of the end product of lipid peroxidation – malondialdehyde (MDA) and free proline in the leaves of untreated plants decreased under the action of the 12 °C temperature, whereas the action of the 4 °C temperature induced their accumulation. Pre-treatment with SA (50 and 100 μM concentrations) reduced electrolyte leakage from the cells of cucumber seedling leaves at both 12 °C and 4 °C. Furthermore, exogenous SA at both normal temperature (22 °C), low hardening (12 °C), and damaging (4 °C) temperature reduced lipid peroxidation, leading to a decrease in MDA level, and contributed to the accumulation of free proline in cotyledon leaves. The resultant data evidence the ability of SA to activate the processes aimed to promote the cold tolerance of cucumber plants.

Введение

Одной из важнейших ответных реакций растений на действие неблагоприятных факторов окружающей среды, в том числе низких температур, является повышение содержания фитогормонов, играющих ключевую роль в ростовых, морфогенетических и адаптивных процессах [Титов, Таланова, 2009]. К таким соединениям, в частности, относится салициловая кислота (СК). СК является эндогенным фитогормоном фенольной природы, который принимает участие в различных физиологических процессах растений [Колупаев, Ястреб, 2013]. Например, она является ингибитором поступления ионов в корни, антагонистом абсцизовой кислоты в регуляции устьичных движений, регулятором транспорта органических веществ по флоэме [Шакирова, 2001], способна активировать альтернативное цианид-устойчивое дыхание [Медведев, 2013], участвует в регуляции процессов прорастания семян, роста, цветения и старения растений [Рахманкулова и др., 2010; Белозерова и др., 2014].

Хорошо известна роль СК в защитных реакциях растений против различных патогенов и в реакциях сверхчувствительности [Медведев, 2013]. При этом она запускает процессы гибели клетки при биотическом стрессе [Alvarez et al., 2000], а также является одной из ключевых сигнальных молекул, которые участвуют в формировании системной приобретенной устойчивости растений [Молодченкова, 2001; Васюкова, Озерецковская, 2007].

В то же время СК играет защитную роль при действии на растения абиотических факторов. В частности, экзогенная СК снижает повреждающее действие засоления [Молодченкова, 2001; Шакирова, 2001; Jayakannan et al., 2015], снижая накопление АФК, активность супероксиддисмутазы (СОД) и пероксидазы [Сахабудинова и др., 2004], а также снимая индуцированное им уменьшение уровня индолилуксусной кислоты и накопление лектина [Шакирова, Безрукова, 1997]. СК также участвует в ответных реакциях растений на действие кадмия [Chao et al., 2010; Sing, Shah, 2015], уменьшая его негативное действие на активность фотосинтетических ферментов и активизируя отложение в клетках корней лигнина, который защищает клетки от токсического действия этого металла [Масленникова и др., 2013]. Наконец, она может выступать в качестве

регулятора экспрессии белков теплового шока (БТШ) у растений и осуществления либо программированной клеточной смерти (ПКС), либо развития защитной программы [Павлова и др., 2009].

В отношении способности СК влиять на холодоустойчивость растений известны лишь отдельные факты. В частности, показано, что СК повышает устойчивость растений кукурузы [Janda et al., 1999], огурца [Колупаев, Ястреб, 2013; Kang et al., 2014], томата и фасоли [Колупаев, Ястреб, 2013] к гипотермии. При этом у проростков огурца СК усиливает экспрессию гена альтернативной оксидазы и активность этого фермента, тем самым уменьшая окислительные повреждения, вызванные действием низких температур [Lei et al., 2010; Колупаев, Ястреб, 2013]. Однако участие и возможная роль СК в процессах формирования повышенной холодоустойчивости растений почти не изучены.

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование влияния экзогенной СК на устойчивость растений огурца к действию низких температур.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований использовали проростки огурца (*Cucumis sativus* L.) гибрида F1 Зозуля. Растения выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе (рН 6,2–6,4) с добавлением микроэлементов в климатической камере при температуре воздуха 22 °С, его относительной влажности 60–70 %, освещенности около 10 клк и 14-часовом фотопериоде. По достижении недельного возраста проростки помещали на раствор СК в концентрации от 50 до 500 мкМ и через 24 ч подвергали воздействию низкой закаливающей (12 °С) или повреждающей (4 °С) температуры в течение 72 и 24 ч соответственно. Контролем служили не обработанные СК растения.

О холодоустойчивости проростков огурца судили по изменению проницаемости мембран клеток листа, которую определяли по выходу электролитов из высечек листьев с использованием кондуктометра [Гришенкова, Лукаткин, 2005].

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) в листьях оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) [Stewart, Bewley, 1980].

Содержание свободного пролина определяли с помощью нингидринового реактива по методу Бейтса с соавторами [Bates et al., 1973].

Повторность в пределах одного варианта опыта при анализе холодоустойчивости, содержания пролина и МДА – 3-кратная. Каждый опыт повторяли не менее 2–3 раз. О достоверности различий между вариантами судили по критерию Стьюдента при $p < 0,05$. В таблице и на рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

Исследования выполнены на приборно-аналитической базе Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

Результаты

Как известно, проницаемость мембран клеток является одним из ранних показателей изменения физиологических функций растительного организма, и ее изменение служит критерием оценки устойчивости растения к абиотическим стрессам [Гришенкова, Лукаткин, 2005]. В предварительном эксперименте нами было изучено влияние СК в диапазоне концентраций от 50 до 500 мкМ на выход электролитов из высечек листьев огурца. Установлено, что обработка проростков огурца СК в этих концентрациях в течение 1 сут снижает выход электролитов или не вызывает его изменения, а следовательно, не оказывает токсического действия на растения (рис. 1, а). При последующем действии температуры 12 °С в течение 3 сут СК в концентрациях 50 и 100 мкМ уменьшала выход электролитов по сравнению с контролем, в концентрациях 200–300 мкМ вызывала его увеличение, особенно значительное при концентрациях 400–500 мкМ (рис. 1, б). Следовательно, действие экзогенной СК на проростки огурца зависит от ее концентрации: низкие концентрации снижают выход электролитов, защищая клетки от стрессового воздействия, а высокие концентрации могут привести к еще более значительным повреждениям. Учитывая это, для последующих экспериментов были выбраны концентрации СК 50 и 100 мкМ.

Изучение влияния температуры 12 °С на проростки огурца показало, что она оказывает на них закалывающий эффект, приводя к снижению выхода электролитов из листьев по сравнению с температурой 22 °С (табл.). В отличие от этого, температура 4 °С уже через 1 сут вызывала сильное повреждение проростков, о чем свидетельствует значительное увеличение выхода

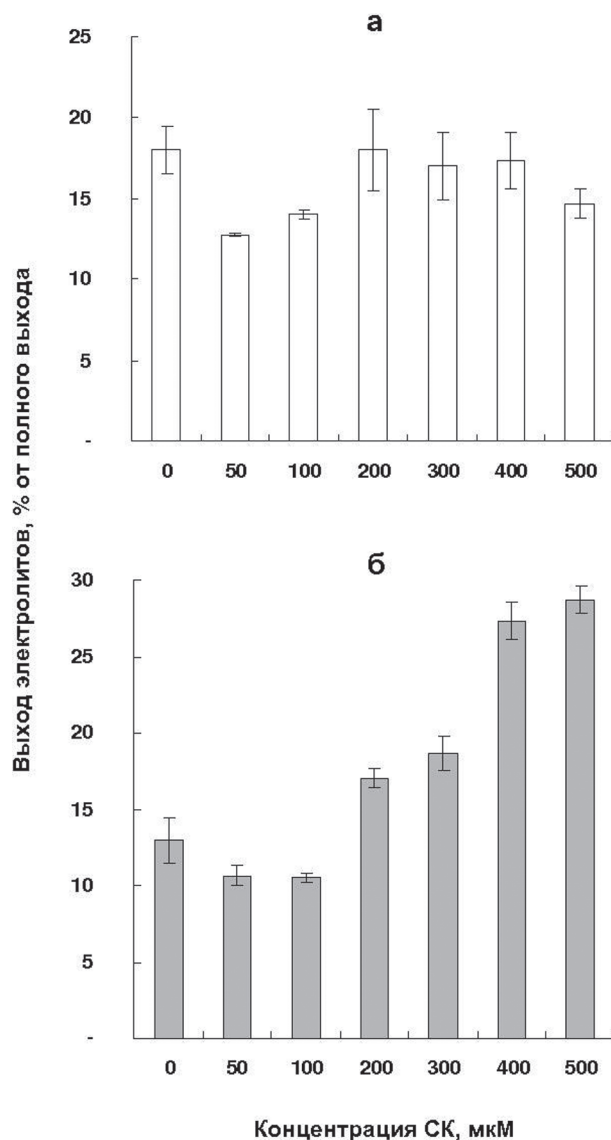


Рис. 1. Влияние СК на выход электролитов (% от полного выхода) из клеток семядольных листьев проростков огурца при действии температуры 22 (а) и 12 (б) °С

Влияние СК на выход электролитов (% от полного выхода) из клеток семядольных листьев проростков огурца при закалывающей (12 °С) и повреждающей (4 °С) температуре

Температура, °C	Концентрация СК, мкМ		
	0	50	100
22	18,00 ± 1,48	12,75 ± 0,11	14,00 ± 0,32
12	12,97 ± 0,67	10,63 ± 0,33	10,49 ± 0,64
4	55,67 ± 2,85	14,67 ± 0,71	16,17 ± 0,09

электролитов из клеток листьев по сравнению с условиями 22 °С (табл.). Предобработка СК в концентрациях 50 и 100 мкМ способствовала защите клеток растений огурца, уменьшая выход электролитов при действии низких температур 12 и 4 °С по сравнению с температурой 22 °С (табл.).

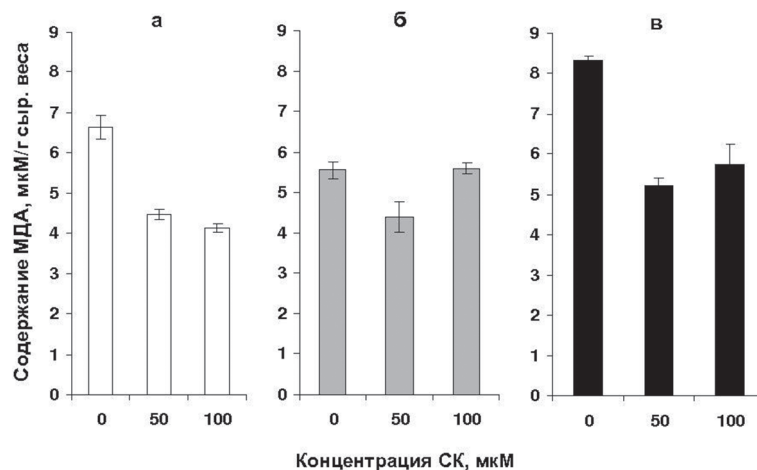


Рис. 2. Влияние СК на содержание МДА в листьях проростков огурца при действии температуры 22 (а), 12 (б) и 4 (в) °С

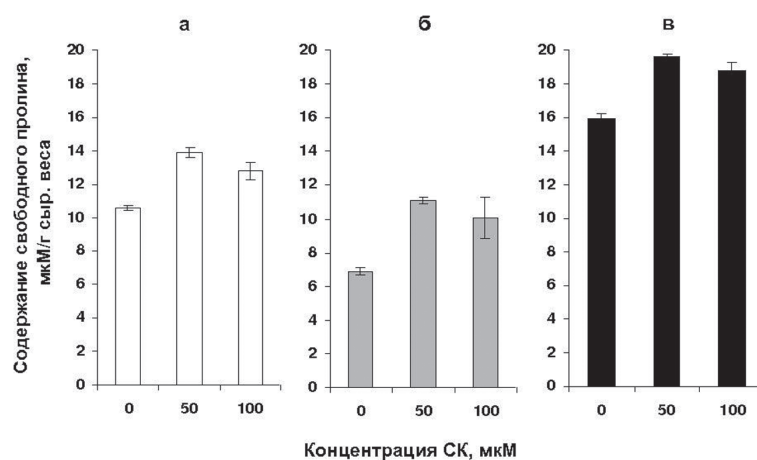


Рис. 3. Влияние СК на содержание свободного пролина в листьях проростков огурца при действии температуры 22 (а), 12 (б) и 4 (в) °С

Закаливающая температура (12 °С) вызывала снижение содержания в листьях контрольных (не обработанных СК) проростков огурца МДА – конечного продукта ПОЛ (рис. 2, б) по сравнению с температурой 22 °С (рис. 2, а), а повреждающая температура (4 °С) приводила к его накоплению (рис. 2, в). Экзогенная СК способствовала снижению уровня МДА при действии температур 22, 12 и 4 °С (см. рис. 2).

При воздействии температуры 12 °С происходило снижение содержания свободного пролина в листьях растений огурца примерно на 35 % (рис. 3, б) относительно 22 °С (рис. 3, а), а при температуре 4 °С – его повышение примерно на 50 % (рис. 3, в). Предобработка проростков СК в концентрациях 50 и 100 мкМ способствовала усилению накопления свободного пролина в семядольных листьях как при нормальной температуре (22 °С) (рис. 3, а), так и при низкотемпературных условиях (12 и 4 °С) (рис. 3, б, в).

Обсуждение

Воздействие низких температур негативно влияет на структуру и проницаемость мембран клеток, вызывая повышение утечки электролитов из тканей растений [Приходько, 1977]. Нами установлено, что температура 4 °С оказывала на проростки огурца повреждающее действие, приводя к нарушению проницаемости мембран. Сходные данные получены на огурце сорта Вязниковский 37: охлаждение при температуре 3 °С вызывало увеличение выхода электролитов уже после часовой экспозиции [Шаркаева, 2001]. Указанные изменения могут происходить в результате возникновения разрывов мембран [Simon, 1974], нарушения избирательной проницаемости [Приходько, 1977]. В отличие от температуры 4 °С при температуре 12 °С происходило снижение выхода электролитов, что свидетельствует об адаптации проростков к указанному воздействию температуры.

СК в концентрациях 50 и 100 мкМ оказывала на проростки огурца протекторное действие, снижая выход электролитов из клеток листьев при действии температуры 4 °С и в меньшей степени при 12 °С (табл.). Ранее другими исследователями на пшенице было показано, что предобработка СК в течение 24 ч оказывала защитное действие на растения при засолении, которое также проявлялось в уменьшении стресс-индуцированного экзосмоса электролитов [Сахабутдинова и др., 2004]. Полученные нами, а также литературные данные свидетельствуют об участии экзогенной СК в повышении холодоустойчивости теплолюбивого вида посредством снижения негативного влияния низких температур на мембраны клеток.

Действие низких температур на структуру мембран клеток связано с развитием окислительного стресса, обусловленного усилением образования АФК, вызывающих повреждения липидов мембран, а также нуклеиновых кислот и инактивацию ферментов [Маевская, Николаева, 2013]. В то же время АФК выступают в качестве сигнальных молекул в запуске каскада защитных реакций в растениях [Сахабутдинова и др., 2004]. Соответственно, баланс между образованием и обезвреживанием АФК имеет решающее значение для выживания растительного организма в стрессовых условиях [Маевская, Николаева, 2013].

Важным показателем устойчивости растений к окислительному стрессу является уровень МДА, который присутствует в тканях растений в низких концентрациях и в обычных условиях [Сахабутдинова и др., 2004], а воздействие стрессовых факторов приводит к увеличению его содержания и последующему ПОЛ. Нами установлено, что при закалывающей температуре 12 °С происходило снижение ПОЛ, что проявилось в уменьшении уровня МДА. В отличие от этого воздействие температуры 4 °С приводило к развитию окислительного стресса, что выражалось в увеличении содержания МДА по сравнению с его уровнем при 22 °С.

Экзогенная СК снижала уровень МДА, а следовательно, и ПОЛ, что, очевидно, способствовало повышению холодоустойчивости проростков огурца как при 12, так и при 4 °С. Отметим, что сходные данные о защитном эффекте СК, связанном со снижением уровня ПОЛ, получены при действии других стресс-факторов на растения. В частности, в листьях риса, предобработанных СК, также происходило снижение содержания МДА, образовавшегося в результате воздействия кадмия [Chao et al., 2010], свинца и ртути [Mishra, Choudhuri, 1999]. На растениях

гороха показано, что интенсивность ПОЛ в последствии теплового шока была ниже у обработанных СК растений, чем у не обработанных [Пестова, 2007]. Предобработка СК способствовала снижению концентрации МДА у растений пшеницы, подвергнутых засолению [Сахабутдинова и др., 2004]. Наряду с этим, СК снижала уровень МДА в корнях проростков пшеницы при аноксии [Кирчихина и др., 2005] и в обычных условиях [Рахманкулова и др., 2010].

Таким образом, с одной стороны, этот гормон проявляет свое антистрессовое действие, усиливая активность СОД, каталазы, пероксидазы, участвующих в утилизации АФК [Сахабутдинова и др., 2004; Колупаев, Ястреб, 2013]. С другой стороны, хорошо известно такое явление, как «окислительный взрыв», вызываемый в растительном организме СК-индуцированным подавлением активности каталазы и аскорбатпероксидазы (АПО), что приводит к накоплению АФК, гибели патогенов и ПКС клеток вокруг места инфекции [Васюкова, Озерецковская, 2007; Белых и др., 2009; Тарчевский и др., 2010; Kang et al., 2014]. В свою очередь, подавление активности каталазы и АПО вызывает генерацию различных форм АФК, что стимулирует накопление СК и усиливает ее воздействие [Махдавиан и др., 2008; Белых и др., 2009].

В целом на основании полученных нами и литературных данных можно сделать вывод о том, что предобработка СК способствует снижению уровня ПОЛ, вызванного действием низких температур. Это предполагает возможность ее участия в защите клеток растений огурца от низкотемпературного стресса. Вероятно, снижение концентрации МДА и развития ПОЛ вызвано преадаптирующим эффектом СК еще до начала воздействия низких температур. Об этом говорит тот факт, что предобработка проростков огурца СК увеличивала содержание свободного пролина как при нормальной температуре (22 °С), так и в условиях низких температур (12 и 4 °С). Как известно, накопление свободного пролина является одной из неспецифических защитных реакций растений на действие различных неблагоприятных факторов. Его участие в повышении устойчивости растений к абиотическим факторам связано с его осмопротекторными и антиоксидантными свойствами, в частности, со способностью уменьшать образование синглетного кислорода, стабилизировать субклеточные структуры и регулировать рН цитоплазмы [Verbruggen, Hermans, 2008; Маевская, Николаева, 2013; Сошинкова и др., 2013; Rejeb et al., 2014]. Следовательно, повышение содержания пролина имеет большое значение для предотвращения

развития окислительного стресса в условиях низких температур.

Аналогичные данные о повышении содержания пролина при обработке СК получены на проростках пшеницы, подвергнутых воздействию хлорида натрия и маннита [Сахабутдинова, 2002]. Эти стрессовые факторы вызывали значительное увеличение содержания пролина в растениях, а предобработка СК обеспечивала поддержание его высокого уровня. На растениях тритикале также было показано, что СК повышает содержание пролина при действии $ZnSO_4$ [Абилова, 2013], а на растениях огурца – в ответ на солевой стресс ($NaCl$ и KCl) [Абилова, 2011]. Причем была отмечена обратная зависимость между интенсивностью накопления пролина и активностью фермента СОД в семядольных листьях огурца, свидетельствующая о том, что основная роль в нейтрализации АФК (в частности, синглетного кислорода) принадлежит именно пролину [Абилова, 2011]. Следовательно, важная роль СК в поддержании жизнедеятельности растительного организма при неблагоприятных воздействиях, в том числе низкотемпературных, может быть связана с повышением содержания пролина, участвующего в процессах антиоксидантной защиты клеток растений.

Заключение

Таким образом, предобработка СК оказывает на проростки огурца адаптогенное воздействие, в результате которого, вероятно, еще до начала действия низкой температуры происходит активация антиоксидантной системы. Это в свою очередь способствует нейтрализации стресс-индуцированного возрастания уровня АФК, а соответственно, приводит к снижению окислительного стресса. В нивелировании АФК принимает участие низкомолекулярный антиоксидант пролин, содержание которого увеличивается под влиянием экзогенной СК, которая способствует предотвращению повреждения целостности мембранных структур, тем самым повышая устойчивость клеток растений огурца к низкой температуре.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0221-2014-0002).

Литература

Абилова Г. А. Салициловая кислота как возможный фактор повышения устойчивости растений

огурца к окислительному стрессу, вызванному засолением среды // Вестник Дагестанского государственного университета. 2011. Вып. 1. С. 103–106.

Абилова Г. А. Участие салициловой кислоты в системе антиоксидантной защиты у тритикале при действии $ZnSO_4$ // Вестник Дагестанского государственного университета. 2013. Вып. 1. С. 124–127.

Белозерова Н. С., Баик А. С., Буцанец П. А. и др. Влияние салициловой кислоты на альтернативный путь дыхания люпина желтого // Физиология растений. 2014. Т. 61, № 1. С. 43–52. doi:10.7868/S0015330314010023.

Белых Ю. В., Кириллова Н. В., Спасенков А. И. Влияние салициловой кислоты на антиоксидантную и прооксидантную активности в растительных клетках // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2009. Сер. 3, вып. 2. С. 145–151.

Васюкова Н. И., Озерецковская О. Л. Индуцированная устойчивость растений и салициловая кислота // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43, № 4. С. 405–411.

Грищенкова Н. Н., Лукаткин А. С. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода // Поволжский экологический журнал. 2005. № 1. С. 3–11.

Кирчихина Н. А., Князева А. А., Емельянов В. В., Чиркова Т. В. Влияние фитогормонов на перекисное окисление липидов в проростках пшеницы и риса в постаноксический период // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2005. Сер. 3, вып. 2. С. 126–131.

Колупаев Ю. Е., Ястреб Т. О. Стресс-протекторные эффекты салициловой кислоты и ее структурных аналогов // Физиология и биохимия культ. растений. 2013. Т. 45, № 2. С. 113–126.

Маевская С. Н., Николаева М. К. Реакция антиоксидантной и осмопротекторной систем проростков пшеницы на засуху и регидратацию // Физиология растений. 2013. Т. 60, № 3. С. 351–359. doi:10.7868/S0015330313030081.

Масленникова Д. Р., Фатхутдинова Р. А., Безрукова М. В. и др. Механизмы протекторного действия салициловой кислоты на растения пшеницы в условиях кадмиевого стресса // Агробиохимия, 2013. № 3. С. 72–79.

Махдавиан К., Горбанли М., Калантари Х. М. Влияние салициловой кислоты на формирование окислительного стресса, индуцированного УФ-светом в листьях перца // Физиология растений. 2008. Т. 55, № 4. С. 62–623.

Медведев С. С. Физиология растений: учебник. СПб.: БХВ-Петербург, 2013. 512 с.

Молодченкова О. О. Предполагаемые функции салициловой кислоты в растениях // Физиология и биохимия культурных растений. 2001. Т. 3, № 6. С. 463–473.

Павлова Е. Л., Рихванов Е. Г., Таусон Е. Л. и др. Влияние салициловой кислоты на развитие индуцированной термотолерантности и индукцию синтеза БТШ в культуре клеток *Arabidopsis thaliana* // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 1. С. 78–84.

Пестова Е. Л. Влияние салициловой кислоты на состояние перекисного гомеостаза растений

гороха при преадаптации к тепловому шоку: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Нижний Новгород, 2007. 23 с.

Приходько Н. В. Изменение проницаемости клеточных мембран как общее звено механизмов неспецифической реакции растений на внешние воздействия // Физиология и биохимия культурных растений. 1977. Т. 9, № 3. С. 301–309.

Рахманкулова З. Ф., Федяев В. В., Рахматуллина С. Р. и др. Влияние предпосевной обработки семян пшеницы салициловой кислотой на ее эндогенное содержание, активность дыхательных путей и антиоксидантный баланс растений // Физиология растений. 2010. Т. 57, № 6. С. 835–840.

Сахабудинова А. Р. Регуляция салициловой кислотой устойчивости пшеницы к стрессовым факторам: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2002. 25 с.

Сахабудинова А. Р., Фатхудинова Д. Р., Шакирова Ф. М. Влияние салициловой кислоты на активность антиоксидантных ферментов у пшеницы в условиях засоления // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40, № 5. С. 579–583.

Сошинкова Т. Н., Радюкина Н. Л., Королькова Д. В., Носов А. В. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salsuginea* при окислительном стрессе // Физиология растений. 2013. Т. 60, № 1. С. 47–60. doi:10.7868/S0015330313010090.

Тарчевский И. А., Яковлева В. Г., Егорова А. М. Салицилат-индуцированная модификация протеомов у растений (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46, № 3. С. 263–275.

Титов А. Ф., Таланова В. В. Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. 206 с.

Шакирова Ф. М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.

Шакирова Ф. М., Безрукова М. В. Индукция салициловой кислотой устойчивости пшеницы к засолению среды // Изв. РАН. Сер. Биол. 1997. № 2. С. 149–153.

Шаркаева Э. Ш. Анатомические и физиологические изменения теплолюбивых растений при различной интенсивности охлаждения: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саранск, 2001. 20 с.

Alvarez M. E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance // Plant Mol. Biol. 2000. Vol. 44. P. 429–442.

Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant and Soil. 1973. Vol. 39, No 1. P. 205–207.

Chao Y. Y., Chen C. Y., Huang W. D., Kao C. H. Salicylic acid-mediated hydrogen peroxide accumulation and protection against Cd toxicity in rice leaves // Plant and Soil. 2010. Vol. 329. P. 327–337. doi:10.1007/s11104-009-0161-4.

Janda T., Szalai G., Tari I., Paldi E. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants // Planta. 1999. Vol. 208. P. 175–180.

Jayakannan M., Bose J., Babourina O. et al. Salicylic acid in plant salinity stress signaling and tolerance // Plant Growth Regul. 2015. Vol. 76. P. 25–40. doi:10.1007/s10725-015-0028-z.

Kang G., Li G., Guo T. Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants // Acta Physiol. Plant. 2014. Vol. 36. P. 2287–2297. doi:10.1007/s11738-014-1603-z.

Lei T., Feng H., Sun X. et al. The alternative pathway in cucumber seedlings under low temperature stress was enhanced by salicylic acid // Plant Growth Regul. 2010. Vol. 60. P. 35–42. doi:10.1007/s10725-009-9416-6.

Mishra A., Choudhuri M. A. Effect of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice // Biol. Plant. 1999. Vol. 42, No 3. P. 409–415.

Rejeb K. B., Abdelly C., Savoure A. How reactive oxygen species and proline face stress together // Plant Physiol. and Biochem. 2014. Vol. 80. P. 278–284.

Sing I., Shah K. Evidences for suppression of cadmium induced oxidative stress in presence of sulphosalicylic acid in rice seedlings // Plant Growth Regul. 2015. Vol. 76. P. 99–110. doi:10.1007/s10725-015-0023-4.

Simon E. W. Phospholipids and plant membrane permeability // New Phytol. 1974. Vol. 73, No 3. P. 377–420.

Stewart R. R. C., Bewley J. D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes // Plant Physiol. 1980. Vol. 65. P. 245–248.

Verburggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: a review // Amino acid. 2008. Vol. 35. P. 753–759. doi:10.1007/s00726-008-0061-6.

Поступила в редакцию 22.05.2015

References

Abilova G. A. Uchastie salitsilovoi kisloty v sisteme antioksidantnoi zashchity u tritikale pri deistvii ZnSO₄ [Salicylic acid participation in triticale antioxidant protection on exposure to ZnSO₄]. *Vestnik Dagestanskogo gosudarstvennogo universiteta* [Herald of Dagestan State University]. 2013. Iss. 1. P. 124–127.

Abilova G. A. Salitsilovaya kislota kak vozmozhnyi faktor povysheniya ustoichivosti rastenii ogurtsa k okislitel'nomu stressu, vyzvannomu zasoleniem sredy [Salicylic acid as a possible factor in increasing the stability of cucumber plants to oxidative stress caused by salinity of environment]. *Vestnik Dagestanskogo*

gosudarstvennogo universiteta [Herald of Dagestan State University]. 2011. Iss. 1. P. 103–106.

Belozerova N. S., Baik A. S., Butsanets P. A., Kuznetsov V. V., Shugaev A. G., Pozhidaeva E. S. Vliyanie salitsilovoi kisloty na al'ternativnyi put' dykhaniya lyupina zheltogo [Effect of salicylic acid on the alternative pathway respiration of yellow lupine]. *Fiziologiya rastenii* [Russian Journal of Plant Physiology]. 2014. Vol. 61, No 1. P. 43–52. doi:10.7868/S0015330314010023.

Belykh Yu. V., Kirillova N. V., Spasenkov A. I. Vliyanie salitsilovoi kisloty na antioksidantnyu i prooksidantnyu aktivnosti v rastitel'nykh kletkakh [Effect of salicylic

acid on anti-oxidant and pro-oxidant activity in plant cells]. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta* [Vestnik of St. Petersburg University]. 2009. Part. 3, iss. 2. P. 145–151.

Grishenkova N. N., Lukatkin A. S. Opredelenie ustoychivosti rastitel'nykh tkanei k abioticheskim stressam s ispol'zovaniem konduktometricheskogo metoda [A conductometric technique to estimate the plant tissues stability to abiotic stresses]. *Povolzhskii ekologicheskii zhurnal* [Povolzhskiy Journal of Ecology]. 2005. No 1. P. 3–11.

Kirchikhina N. A., Knyazeva A. A., Emel'yanov V. V., Chirkova T. V. Vliyanie fitogormonov na perekisnoe okislenie lipidov v prorostkakh pshenitsy i risa v postanoksicheskii period [Effect of phytohormones on lipid peroxidation in wheat and rice seedlings in the post-anoxic period]. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta* [Vestnik of St. Petersburg University]. 2005. Ser. 3, iss. 2. P. 126–131.

Kolupaev Yu. E., Yastreb T. O. Stress-protectors efekty salitsilovoi kisloty i ee strukturnykh analogov [Stress-protective effects of salicylic acid and its structural analogues]. *Fiziologiya i biokhimiya kul't. rastenii* [Physiology and biochemistry of cultivated plants]. 2013. Vol. 45, No 2. P. 113–126.

Maevskaya S. N., Nikolaeva M. K. Reaktsiya antioksidantnoi i osmoprotektoinoi sistem prorostkov pshenitsy na zasukhu i regidratatsiyu [Response of antioxidant and osmoprotective systems of wheat seedlings to drought and rehydration]. *Fiziologiya rastenii* [Russian Journal of Plant Physiology]. 2013. Vol. 60, No 3. P. 351–359. doi: 10.7868/S0015330313030081.

Maslennikova D. R., Fatkhutdinova R. A., Bezrukova M. V., Allagulova Ch. R., Klyuchnikova E. O., Shakirova F. M. Mekhanizmy protektoino deistviya salitsilovoi kisloty na rasteniya pshenitsy v usloviyakh kadmievogo stressa [The mechanisms of the protective action of salicylic acid on wheat plants under cadmium stress]. *Agrokhiimiya* [Agrochemistry]. 2013. No 3, P. 72–79.

Makhdavian K., Gorbanii M., Kalantari Kh. M. Vliyanie salitsilovoi kisloty na formirovanie okislitel'nogo stressa, indutsirovannogo UF-svetom v list'yakh pertsy [Role of salicylic acid in regulating ultraviolet radiation-induced oxidative stress in pepper leaves]. *Fiziologiya rastenii* [Russian Journal of Plant Physiology]. 2008. Vol. 55, No 4. P. 62–623.

Medvedev S. S. Fiziologiya rastenii: uchebnik [Plant physiology. Tutorial]. St. Petersburg: BKhV-Peterburg, 2013. 512 p.

Molodchenkova O. O. Predpolagaemye funktsii salitsilovoi kisloty v rasteniyakh [Estimated functions of salicylic acid in plants]. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii* [Physiology and biochemistry of cultivated plants]. 2001. Vol. 3, No 6. P. 463–473.

Pavlova E. L., Rikhvanov E. G., Tauson E. L., Varakina N. N., Gamburg K. Z., Rusalaeva T. M., Borovskii G. B., Voinikov V. K. Vliyanie salitsilovoi kisloty na razvitie indutsirovannoi termotolerantnosti i induktsiyu sinteza BTSv v kul'ture kletok *Arabidopsis thaliana* [Effect of salicylic acid on the development of induced thermotolerance and induction of HSP synthesis in *Arabidopsis thaliana* cell culture]. *Fiziologiya rastenii* [Russian Journal of Plant Physiology]. 2009. Vol. 56, No 1. P. 78–84.

Pestova E. L. Vliyanie salitsilovoi kisloty na sostoyanie perekisnogo gomeostaza rastenii gorokha pri predadaptatsii k teplovomu shoku [Effect of salicylic acid on the state of peroxide homeostasis in pea plants with preadaptation to thermal shock]: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk [PhD Diss (Biol.)]. Nizhnii Novgorod, 2007. 23 p.

Prikhod'ko N. V. Izmenenie pronitsaemosti kletochnykh membran kak obshchee zveno mekhanizmov nespetsificheskoi reaktsii rastenii na vneshnie vozdeistviya [Changes in the permeability of cell membranes as a common link of nonspecific mechanisms of plant response to external influences]. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii* [Physiology and biochemistry of cultivated plants]. 1977. Vol. 9, No. 3. P. 301–309.

Rakhmankulova Z. F., Fedyaev V. V., Rakhmatullina S. R., Ivanov S. P., Gil'vanova I. R., Usmanov I. Yu. Vliyanie predposevnoi obrabotki semyan pshenitsy salitsilovoi kislotoi na ee endogennoe sodержanie, aktivnost' dykhatel'nykh putei i antioksidantnyi balans rastenii [The effect of wheat seed pre-sowing treatment with salicylic acid on its endogenous content, activity of respiratory pathways and plant antioxidant status]. *Fiziologiya rastenii* [Russian Journal of Plant Physiology]. 2010. Vol. 57, No 6. P. 835–840.

Sakhabutdinova A. R. Regulatsiya salitsilovoi kislotoi ustoychivosti pshenitsy k stressovym faktoram [Regulation of wheat resistance to stress factors with salicylic acid]: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk [PhD Diss. (Biol.)]. Ufa, 2002. 25 p.

Sakhabutdinova A. R., Fatkhutdinova D. MR., Shakirova F. M. Vliyanie salitsilovoi kisloty na aktivnost' antioksidantnykh fermentov u pshenitsy v usloviyakh zasoleniya [Effect of salicylic acid on the activity of antioxidant enzymes in wheat under conditions of salination]. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied biochemistry and microbiology]. 2004. Vol. 40, No 5. P. 579–583.

Shakirova F. M. Nespetsificheskaya ustoychivost' rastenii k stressovym faktoram i ee regulatsiya [Nonspecific resistance of plants to stress factors and its regulation]. Ufa: Gilem, 2001. 160 p.

Shakirova F. M., Bezrukova M. V. Induktsiya salitsilovoi kislotoi ustoychivosti pshenitsy k zasoleniyu sredi [Induction of wheat resistance against environmental salinization by salicylic acid]. *Izv. RAN. Ser. Biol.* 1997. No 2. P. 149–153.

Sharkaeva E. Sh. Anatomicheskie i fiziologicheskie izmeneniya teplolyubivykh rastenii pri razlichnoi intensivnosti okhlazhdeniya [Anatomical and physiological changes in heat-loving plants at different intensity of cooling]: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk [PhD Diss. (Biol.)]. Saransk, 2001. 20 p.

Soshinkova T. N., Radyukina N. L., Korol'kova D. V., Nosov A. V. Prolin i funktsionirovanie antioksidantnoi sistemy rastenii i kul'tiviruemyykh kletok *Thellungiella salsauginea* pri okislitel'nom stresse [Proline and functioning of the antioxidant system in *Thellungiella salsauginea* plants and cultured cells subjected to oxidative stress]. *Fiziologiya rastenii* [Russian Journal of Plant Physiology]. 2013. Vol. 60, No 1. P. 47–60. doi:10.7868/S0015330313010090.

Tarchevskii I. A., Yakovleva V. G., Egorova A. M. Salitsilat-indutsirovannaya modifikatsiya protemov u rastenii (obzor) [Salicylate-induced modification of plant

proteomes (review)]. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya [Appl. biochemistry and microbiology]*. 2010. Vol. 46, No 3. P. 263–275.

Titov A. F., Talanova V. V. Ustoichivost' rastenii i fitogormony [Plant resistance and phytohormones]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2009. 206 p.

Vasyukova N. I., Ozeretskovskaya O. L. Indutsirovannaya ustoichivost' rastenii i salitsilovaya kislota [Induced plant resistance and salicylic acid]. *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya [Appl. biochemistry and microbiology]*. 2007. Vol. 43, No 4. P. 405–411.

Alvarez M. E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 2000. Vol. 44. P. 429–442.

Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973. Vol. 39, No 1. P. 205–207.

Chao Y. Y., Chen C. Y., Huang W. D., Kao C. H. Salicylic acid-mediated hydrogen peroxide accumulation and protection against Cd toxicity in rice leaves. *Plant and Soil*. 2010. Vol. 329. P. 327–337. doi:10.1007/s11104-009-0161-4.

Janda T., Szalai G., Tari I., Paldi E. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*. 1999. Vol. 208. P. 175–180.

Jayakannan M., Bose J., Babourina O., Rengel Z., Shabala S. Salicylic acid in plant salinity stress signaling and tolerance. *Plant Growth Regul.* 2015. Vol. 76. P. 25–40. doi:10.1007/s10725-015-0028-z.

Kang G., Li G., Guo T. Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. *Acta Physiol Plant.* 2014. Vol. 36. P. 2287–2297. doi:10.1007/s11738-014-1603-z.

Lei T., Feng H., Sun X., Dai Q. L., Zhang F., Liang H. G., Lin H. H. The alternative pathway in cucumber seedlings under low temperature stress was enhanced by salicylic acid. *Plant Growth Regul.* 2010. Vol. 60. P. 35–42. doi:10.1007/s10725-009-9416-6.

Mishra A., Choudhuri M. A. Effect of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice. *Biol. Plant.* 1999. Vol. 42, No 3. P. 409–415.

Rejeb K. B., Abdelly C., Savoure A. How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiol. and Biochem.* 2014. Vol. 80. P. 278–284.

Sing I., Shah K. Evidences for suppression of cadmium induced oxidative stress in presence of sulphosalicylic acid in rice seedlings. *Plant Growth Regul.* 2015. Vol. 76. P. 99–110. doi:10.1007/s10725-015-0023-4.

Simon E. W. Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytol.* 1974. Vol. 73, No 3. P. 377–420.

Stewart R. R. C., Bewley J. D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* 1980. Vol. 65. P. 245–248.

Verburggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: a review. *Amino acid.* 2008. Vol. 35. P. 753–759. doi:10.1007/s00726-008-0061-6.

Received May 22, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Фенько Анна Анатольевна

аспирант
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Карелия, Россия, 185910
эл. почта: angelina911@ya.ru
тел.: (8142) 762712

Репкина Наталья Сергеевна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nrt9@ya.ru
тел.: (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

CONTRIBUTORS:

Fenko, Anna

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: angelina911@ya.ru
tel.: (8142) 762712

Repkina, 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

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

УДК 581.13

ТРАНСПОРТ И ЗАПАСАНИЕ САХАРОВ ВО ФЛОЭМЕ *BETULA PENDULA* ROTH VAR. *PENDULA* И VAR. *CARELICA*

Л. Л. Новицкая, Н. А. Галибина, К. М. Никерова

Институт леса Карельского научного центра РАН

Ранее мы предположили, что причиной формирования узорчатой древесины карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica*) служит появление избытка сахарозы во флоэме и камбиальной зоне. В основе эффективного механизма сахарочувствительности лежит способность клеток ощущать скорее поток сахаров, чем просто их присутствие во внутри- и внеклеточном пространстве. Поэтому с точки зрения влияния на морфогенез клеток и тканей растения особая роль принадлежит транспортной сахарозе, поток которой воздействует на сенсоры, инициирующие сигналы, передаваемые на сахар-модулируемые гены. Мы исследовали пул сахарозы в тканях ствола обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской березы, принимая во внимание транспортную и запасную формы дисахарида. Для этого определяли содержание сахарозы и активность расщепляющих ее ферментов (сахарозосинтаза, инвертазы: апопластная вакуолярная, цитоплазматическая). Установлено, что в период камбиального роста у карельской березы, как и у обычной березы, сахароза является практически единственным сахаром флоэмного экссудата, т. е. служит основной транспортной формой углеводов. На основе сопоставления данных по содержанию сахаров и активности ферментов показано, что: (1) сахароза во флоэме березы не выполняет запасную функцию, (2) весь пул сахарозы здесь следует рассматривать как транспортную сахарозу, (3) в период деятельности камбия роль мобильного резерва сахаров во флоэме березы выполняет фруктоза, (4) фруктоза у березы является запасным сахаром в период зимнего покоя, совмещая эту функцию с ролью криопротектора.

Ключевые слова: *Betula pendula* Roth; узорчатая древесина; флоэма; активность инвертазы и сахарозосинтазы; содержание сахарозы, глюкозы и фруктозы.

L. L. Novitskaya, N. A. Galibina, K. M. Nikerova. SUGAR TRANSPORT AND STORAGE IN THE PHLOEM OF *BETULA PENDULA* ROTH VAR. *PENDULA* AND VAR. *CARELICA*

We have previously hypothesized that the cause of figured wood formation in Karelian birch (*Betula pendula* Roth var. *carelica*) is excessive sucrose supply to the phloem and the cambial zone. The ability of cells to sense the flux of sugars rather than the presence of sugars in the intra- and extracellular space forms the basis of an efficient sugar sensing machinery. Therefore, transport sucrose plays a special role in terms of the impact on the morphogenesis of plant cells and tissues. Sucrose flow affects the sensors that trigger the signals transmitted to sugar-modulated genes. We investigated the pool of sucrose in trunk tissues of common silver birch (*B. pendula* var. *pendula*) and Karelian birch taking into account transport and storage forms of the disaccharide. For this purpose the sucrose content and the activity of enzymes which break it down (sucrose synthase, in-

vertases: apoplastic, vacuolar, cytoplasmic) were determined. It was found that during the period of cambial growth sucrose is almost the only sugar in the phloem exudate of Karelian birch as in common silver birch, i. e. it serves as the main transport form of carbohydrates. Data on sugar content and the activity of enzymes were compared to show that: (1) sucrose in birch phloem does not perform the storage function, (2) the entire sucrose pool here should be regarded as transport sucrose, (3) during the cambial activity period the role of the labile sugar pool in birch phloem is performed by fructose, (4) fructose in birch is the storage sugar during winter dormancy, as well as a cryoprotectant.

Keywords: Silver Birch; patterned wood; phloem; activity of invertase and sucrose synthase; content of sucrose, fructose and glucose.

Введение

В соответствии с разрабатываемой нами гипотезой, формирование структурных аномалий ствола карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica*) индуцируется появлением избытка транспортной сахарозы в проводящей флоэме и камбиальной зоне. Данный вывод сделан на основе результатов физиолого-биохимических и анатомо-цитологических исследований и постановки экспериментов [Новицкая 1997, 1999, 2008; Novitskaya, 1998; Novitskaya, Kushnir, 2006; Галибина и др., 2012, 2013, 2014, 2015а, б; Галибина, Терехова, 2014].

Морфогенетическая роль сахарозы определяется двумя основными факторами: (1) она является транспортной формой фотоассимилятов у растений и поэтому служит исходным субстратом для синтеза структурных элементов клеток и тканей; (2) сахароза оказывает влияние на экспрессию сахар-модулируемых генов [Graham, 1996; Koch, 1996; Sheen et al., 1999; Smeekens, 1998; Gibson, 2000, 2004], что имеет серьезные метаболические последствия, вплоть до изменения программы развития клеток.

Метаболизм клеток растения во многом зависит от концентрации сахаров, однако содержание сахара само по себе не дает полного представления о сахарном статусе клетки. Считается, что в основе эффективного механизма сахарочувствительности лежит способность клеток ощущать скорее поток сахаров, чем просто их присутствие во внутри- и внеклеточном пространстве [Loreti et al., 2001]. Таким образом, с точки зрения влияния на морфогенез клеток и тканей растения особая роль принадлежит транспортной сахарозе, поток которой воздействует на сенсоры, инициирующие сигналы, передаваемые на сахар-модулируемые гены.

Известно, что у некоторых растений сахароза, помимо участия в транспорте и обмене веществ, выполняет функции запасного соединения. Например, у сахарной свеклы и сахарного

тростника она в больших количествах накапливается в вакуолярном пространстве клеток [Курсанов, 1976]. Запасная сахароза – это метаболит, который временно не участвует в обменных процессах и хранится в вакуолях клеток паренхимы под защитой тонопласта. Поэтому при обсуждении морфогенетического эффекта сахарозы следует знать, в каком виде она присутствует – в виде транспортной или запасной.

Установлено, что у обычной березы повислой в период вегетации сахароза является практически единственным сахаром флоэмного экссудата, лишь осенью здесь появляется небольшое количество раффинозы и стахиозы [Колесниченко, 1985]. Для карельской березы подобные сведения отсутствуют.

В задачи нашего исследования входило: (1) выявить основную транспортную форму сахаров у карельской березы; (2) установить, выполняет ли сахароза у березы повислой только транспортную функцию или является также запасной формой ассимилятов.

Объекты и методы исследования

Объекты исследования

Объектами исследования были две формы березы повислой: обычная береза повислая (далее – обычная береза) *Betula pendula* Roth var. *pendula*, с прямослойной древесиной, и карельская береза *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, с аномальным строением проводящих тканей ствола. Все опытные растения произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН в 2 км от г. Петрозаводска (61°45' с. ш., 34°20' в. д.).

Возраст опытных деревьев 30 лет. Исследования проводили при разных физиологических состояниях дерева: периоды набухания почек (апрель), активного камбиального роста (июнь–июль), подготовки к покою (октябрь) и вынужденного покоя (февраль).

Отбор образцов

Образцы тканей ствола для биохимического анализа брали на высоте 1,3 м от земли. У карельской березы выбирали участки с наибольшей степенью проявления структурных аномалий. Отделяли кору от древесины. С внутренней стороны коры с помощью бритвенного лезвия срезали слои тканей, соответствующие камбиальной зоне, зонам проводящей и непроводящей флоэмы. С поверхности коры удаляли пробку (бересту) и снимали слой, соответствующий феллодерме. С обнаженной поверхности древесины срезали наружные слои ксилемы текущего года. Варианты, обозначенные «флоэма», включали в себя камбиальную зону и зону проводящей флоэмы. Соответствие тканей тем или иным слоям контролировали под микроскопом.

Материал для биохимических исследований фиксировали жидким азотом с последующим лиофильным высушиванием.

Методика сбора ксилемного экссудата в период весеннего сокодвижения («плач» березы). Подсочку опытных деревьев осуществляли в соответствии с принятыми рекомендациями [Орлов, 1963]. С южной стороны дерева на высоте 1,3 м от корневой шейки с помощью бурава просверливали отверстие диаметром 5 мм с небольшим наклоном к земле. Следили, чтобы бурав входил в древесину на глубину 1,5 см. В отверстия вставляли скрученные волокна лишайника уснеи (*Usnea*), концы которых опускали в пробирки. Пробирки с соком помещали в контейнер со льдом.

Биохимические исследования

Определение сахаров. Выделение и экстракцию сахаров проводили по методике, которая подробно описана ранее [Галибина и др., 2014]. Углеводы дважды экстрагировали 80%-м этиловым спиртом при 50 °С в течение 30 минут. Спиртовые экстракты объединяли и упаривали на водяной бане при температуре 35–40 °С. Полученный сухой остаток, содержащий моно-, ди- и олигосахариды, растворяли в 3–5 мл (в зависимости от предполагаемого количества углеводов) бидистиллированной воды и фильтровали через бумажные фильтры. Полученный фильтрат подвергали тщательной очистке методом твердофазной экстракции (ТФЭ) для освобождения от посторонних компонентов, таких как пигменты, полисахариды, различные соли и органические кислоты. Для этого растворы образцов пропускали через мембранные фильтры ($d = 25 \text{ mm}$, $0.45 \mu\text{m}$, Nylon) (ProFill, Германия), а потом через

картриджи для ТФЭ (NH_2 , 500 mg/6 ml, 55 μm , 70 A) (Phenomemex Strata, США).

Охлажденный ксилемный сок подвергали тщательной очистке методом ТФЭ.

Содержание растворимых углеводов в экстракте анализировали на ВЭЖХ-системе серии «Стайер» (Аквилон, Россия) при следующих условиях: колонка Rezex RCM-Monosaccharide (Phenomemex, США), элюент – бидистиллированная вода, скорость потока элюента 0,6 мл/мин, детектор – рефрактометр. Критерием идентификации пиков служило время удерживания стандартных веществ: сахарозы, глюкозы, фруктозы (Panreac, Испания). Содержание углеводов выражали в мг на г сухой ткани.

Анализ активности ферментов

Транспорт сахарозы в клетках и тканях растения осуществляется по градиенту концентрации, который создается в результате активности расщепляющих ее ферментов. Распад сахарозы происходит с участием ферментов, отличающихся по месту локализации: клеточная стенка – апопластная инвертаза (АпИнв), вакуоль – вакуолярная инвертаза (ВаКИнв), цитозоль – цитоплазматическая инвертаза (ЦитИнв) и сахарозосинтаза (СС).

Активность ферментов определяли по методике, которая описана ранее [Галибина и др., 2015а, б]. Растительные ткани растирали в жидком азоте до однородной массы и гомогенизировали при 4 °С в буфере следующего состава: 50 мМ Hepes (pH 7,5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ PMSF. После 20-минутной экстракции гомогенат центрифугировали при 10 000 g в течение 20 минут (центрифуга Sigma 2-16PK, Германия). Осадок трехкратно промывали буфером. Осадок и объединенный супернатант диализовали при 4 °С в течение 18–20 часов против буфера для гомогенизации, разбавленного в 10 раз. В осадке определяли АпИнв, в супернатанте – ВаКИнв, ЦитИнв и СС. Активность ферментов определяли после инкубации полученного препарата при 30 °С в течение 30 минут. Инкубационная среда для определения активности инвертазы содержала 100 мМ ацетатного буфера, pH 4,7 (апопластный и вакуолярный фермент) или 50 мМ Hepes, pH 7,5 (цитоплазматическая инвертаза), концентрация сахарозы – 25 мМ. Количество образовавшейся в процессе инкубации глюкозы определяли глюкозооксидазным методом. Инкубационная среда для определения активности сахарозосинтазы содержала 70 мМ Hepes (pH 7,4), 5 мМ MgCl_2 , 1 мМ уридиндифосфата, 1 мМ пиродифосфата, 1 мМ НАДФ, 50 мМ сахарозы,

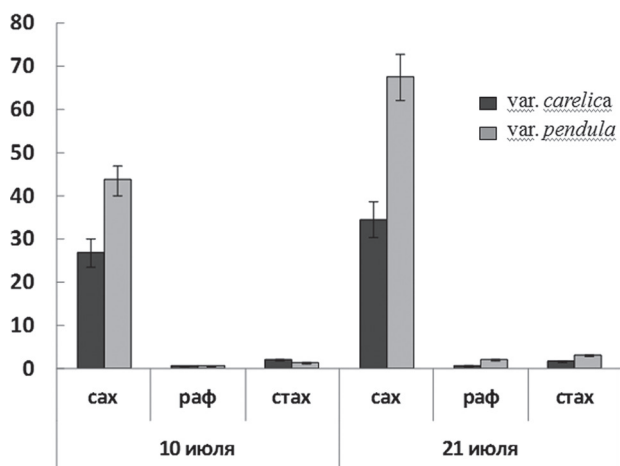


Рис. 1. Содержание транспортных форм сахаров (мг/г сухого веса) во флоэме обычной березы повислой (*var. pendula*) и карельской березы (*var. carelica*)

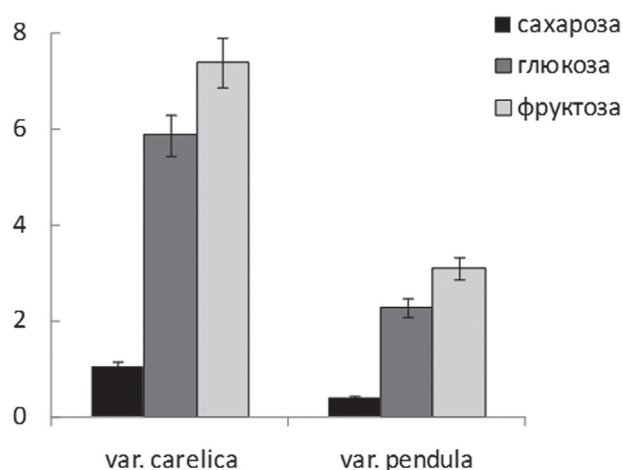


Рис. 2. Содержание сахаров в ксилемном соке (мг/л) обычной березы повислой (*var. pendula*) и карельской березы (*var. carelica*) в период весеннего сокодвижения («плача» берез). 21 апреля

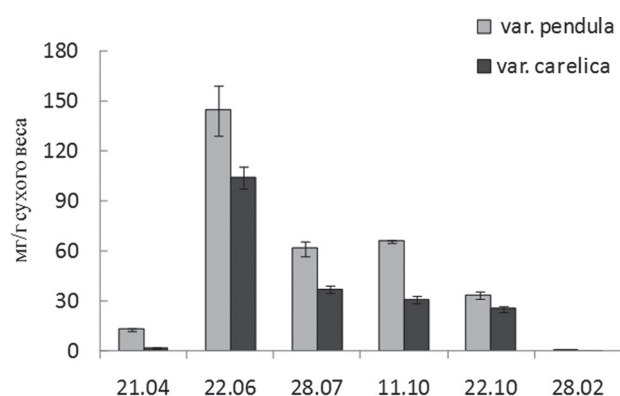


Рис. 3. Содержание сахарозы (мг/г сухого веса) во флоэме обычной березы повислой (*var. pendula*) и карельской березы (*var. carelica*) при разных физиологических состояниях дерева: периоды набухания почек (21 апреля), активного камбиального роста (22 июня, 28 июля), подготовки к покою (11 и 22 октября) и вынужденного покоя (28 февраля)

1 U глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 2 U фосфоглюкомутазы. Активность СС определяли в направлении распада сахарозы спектрофотометрически по восстановлению НАДФ при $\lambda = 340$ нм (спектрофотометр СФ-2000, Россия). Активность инвертазы и СС выражали в мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани.

Все биохимические анализы были выполнены с использованием оборудования центра коллективного пользования «Аналитическая лаборатория» Института леса КарНЦ РАН.

Статистическая обработка

Данные обработаны статистически с использованием пакета программ Statgraphics for Windows 7.0. Данные представлены в виде средних значений и доверительных интервалов.

Результаты

Содержание транспортных сахаров во флоэме

Среди транспортных форм сахаров у березы повислой выделяют сахарозу и олигосахара семейства раффинозы (раффиноза, стахиоза, вербаскоза). Поскольку вербаскоза редко встречается у видов березы и только в следовых количествах [Zimmermann, Ziegler, 1975], ее содержание не определяли.

10 июля во флоэме двух форм березы повислой наблюдалось высокое содержание сахарозы, в то время как количество раффинозы и стахиозы было в 20–40 раз меньше (рис. 1). К 21 июля содержание сахарозы возросло ~ в 1,5 раза, а олигосахаридов существенно не изменилось. У карельской березы по сравнению с обычной березой количество сахарозы во флоэме в 1,5–2 раза меньше.

Содержание сахаров в ксилемном соке

У карельской березы суммарное количество сахаров в ксилемном соке (14,4 мг/л) в 2,5 раза больше по сравнению с обычной березой (5,8 мг/л). Среди сахаров у обеих форм березы преобладали моносахара (фруктоза и глюкоза), количество которых было в 5–7 раз больше, чем сахарозы (рис. 2).

Динамика сахарозы во флоэме

С апреля по октябрь содержание сахарозы во флоэме обычной березы было выше, чем у карельской березы. Сезонные колебания сахарозы у обеих берез одинаковые. Так,

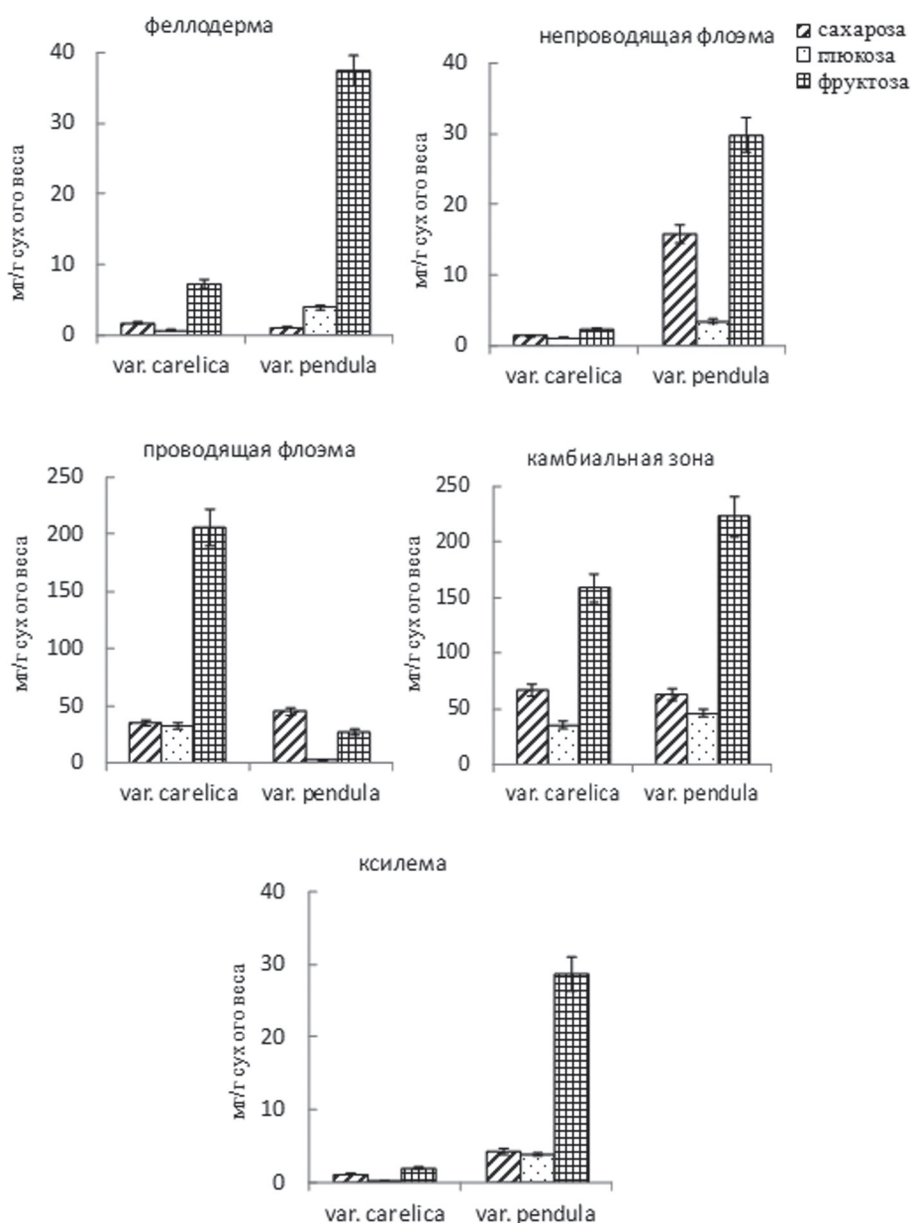


Рис. 4. Содержание сахарозы, глюкозы и фруктозы (мг/г сухого веса) в слоях тканей ствола обычной березы повислой (*var. pendula*) и карельской березы (*var. carelica*) в период камбиального роста (28 июля)

в начале вегетационного периода количество дисахарида увеличивалось, достигая к концу второй декады июня максимального значения – 144,6 и 104,5 мг/г у обычной и карельской березы соответственно. К концу июля содержание сахарозы снизилось в 2,5–3 раза, в октябре оно стало еще ниже, в феврале сахароза практически отсутствовала (рис. 3).

Содержание сахаров в тканях ствола во второй половине периода активного камбиального роста

Изучение распределения сахаров по тканям ствола в конце июля показало, что основное их

количество приходилось на проводящую флоэму и камбиальную зону. Почти во всех тканях (за исключением проводящей флоэмы у обычной березы) содержание фруктозы выше по сравнению с сахарозой и глюкозой (рис. 4). Распределение сахаров по тканям у двух форм березы различалось. В феллодерме содержание сахарозы примерно одинаковое, при этом у обычной березы наблюдалось в 5 раз больше глюкозы и фруктозы. В непроводящей флоэме у обычной березы при большем в 10 раз количестве сахарозы содержание глюкозы и фруктозы было выше в 3 и 10 раз соответственно, а в проводящей флоэме – на фоне близких уровней сахарозы содержание глюкозы

Активность апопластной (АпИнв), вакуолярной (ВакИнв), цитоплазматической (ЦитИнв) инвертазы и сахарозосинтазы (СС) во флоэме обычной березы повислой и карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *pendula* и var. *carelica*).

Дата отбора	Активность фермента, мкмоль на г сырой ткани								% ВакИнв в Σ ВакИнв+ЦитИнв+СС	
	АпИнв		ВакИнв		ЦитИнв		СС		var. <i>pendula</i>	var. <i>carelica</i>
	var. <i>pendula</i>	var. <i>carelica</i>	var. <i>pendula</i>	var. <i>carelica</i>	var. <i>pendula</i>	var. <i>carelica</i>	var. <i>pendula</i>	var. <i>carelica</i>		
21 апреля	12,8 ± 1,1	49,9 ± 4,2	1,05 ± 0,07	1,06 ± 0,07	0,32 ± 0,02	0,60 ± 0,04	0,06 ± 0,004	0,003 ± 0,0002	73	64
22 июня	4,5 ± 0,5	10,7 ± 1,1	0,96 ± 0,06	4,20 ± 0,30	0,95 ± 0,07	1,10 ± 0,08	0,02 ± 0,001	0,01 ± 0,001	50	79
11 октября	5,7 ± 0,61	22,5 ± 2,3	0,85 ± 0,05	1,32 ± 0,09	0	0,21 ± 0,01	0,08 ± 0,005	0,19 ± 0,010	91	76

и фруктозы было ~ в 10 раз меньше. В камбиальной зоне при одинаковом количестве сахарозы содержание глюкозы и фруктозы у обычной березы выше в 1,3 раза. В ксилеме большее в 3,5 раза содержание сахарозы у обычной березы сопровождалось большим в 13 раз количеством глюкозы и фруктозы по сравнению с карельской березой (см. рис. 4).

Содержание сахаров в период покоя

В конце февраля содержание сахарозы у карельской березы близко к нулю (см. рис. 3). Уровень фруктозы (31,8 мг/г) превосходил содержание глюкозы (7,2 мг/г) в 4 раза.

Активность ферментов метаболизации сахарозы

У обычной березы повислой во флоэме активность АпИнв была значительно выше по сравнению с другими ферментами, расщепляющими сахарозу (табл.). Во флоэме карельской березы также наибольшей активностью отличалась апопластная инвертаза. В мае у карельской березы значения ее были самыми высокими за весь сезон вегетации (50 мкмоль/г сырой ткани) и в 3,9 раза превысили таковую во флоэме обычной березы. В июне активность АпИнв у карельской березы была выше в 2,4 раза, а в октябре в 4 раза, чем у обычной березы. Еще одна отличительная особенность карельской березы – высокая активность в июне ВакИнв; значения ее были в 4 раза выше по сравнению с обычной березой. В октябре во флоэме активность кислых инвертаз (АпИнв и ВакИнв) была довольно высокой, но ниже, чем в мае.

Обсуждение

Формирование структурных аномалий проводящих тканей в стволе карельской березы подвержено сезонным колебаниям. Обычно после весеннего пробуждения камбия

формируются ткани относительно нормального строения, а с начала июля в коре и древесине дифференцируется большое количество паренхимных клеток, которые в древесине образуют характерный узор [Любавская, 1978; Новицкая, 2008]. Основным источником для формирования структурных элементов тканей ствола являются фотосинтаты. Анализ содержания транспортных сахаров во флоэме исследуемых форм березы в первой и третьей декадах июля показал, что карельская береза не отличается от обычной березы по качественному составу сахаров: в обоих случаях транспортные сахара представлены практически одной сахарозой (см. рис. 1). Полученные результаты совпадают с известными данными для обычной березы повислой [Колесниченко, 1985].

Для поддержания транспорта сахарозы необходимо создание ее концентрационного градиента между донорными и акцепторными клетками и тканями, что обеспечивается интенсивной утилизацией дисахарида в зонах потребления. Во флоэме исследуемых деревьев были обнаружены все ферменты, осуществляющие расщепление сахарозы: АпИнв, ВакИнв, ЦитИнв и СС. Это указывает на распад сахарозы как во внутриклеточных компартментах, так и в апопласте (см. табл.). Известно, что в ситовидных трубках инвертаза отсутствует [Кеппеске et al., 1971; Курсанов, 1976], поэтому выявленную активность трех форм инвертазы следует относить к паренхимным клеткам.

На примере сахарного тростника и сахарной свеклы установлено, что накопление сахарозы в тканях сопряжено с подавлением активности ВакИнв [Hatch, Glasziou, 1963; Энгель, Холодова, 1969]. Поскольку у обеих форм березы активность ВакИнв составила 50–91 % от общей активности внутриклеточных ферментов (см. табл.), можно сделать вывод об интенсивном расщеплении сахарозы в вакуолях паренхимных клеток флоэмы этих растений. Сравнительно высокая активность вакуолярного фермента позволяет заключить, что сахароза не может

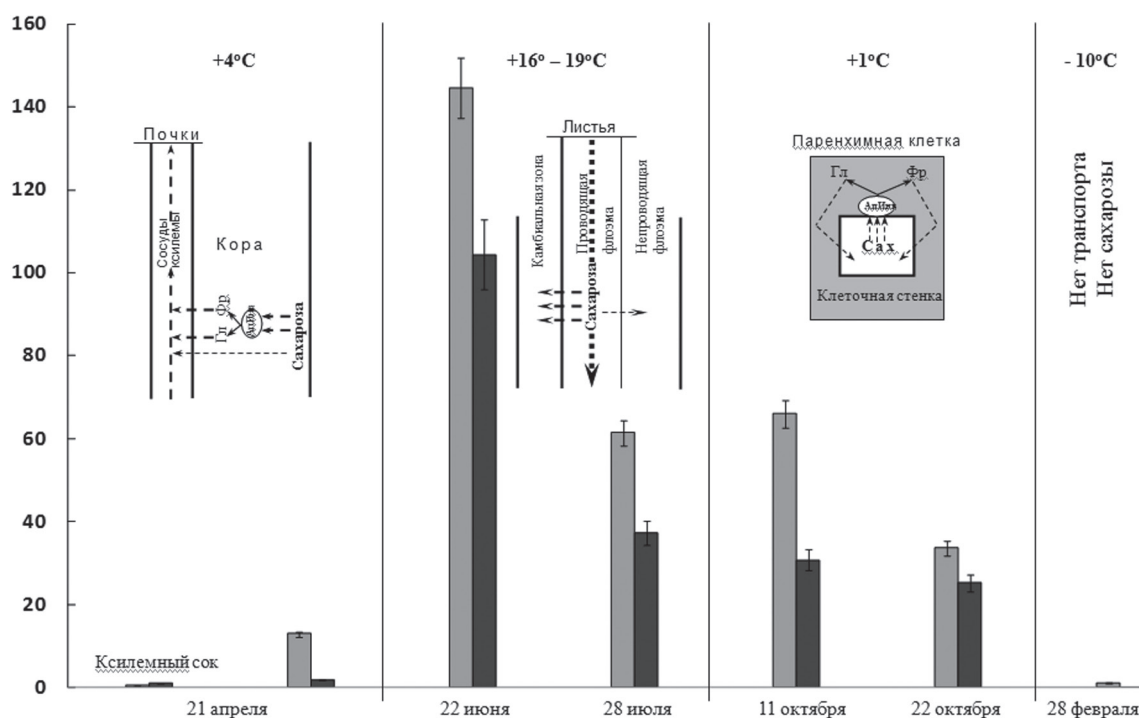


Рис. 5. Содержание сахарозы во флоэме (мг/г сухого веса) и ксилемном соке (мг/л (указан отдельно, собран 21 апреля) обычной березы повислой (*var. pendula*) и карельской березы (*var. carelica*) при разных физиологических состояниях дерева: периоды набухания почек (21 апреля), активного камбиального роста (22 июня, 28 июля), подготовки к покою (11 и 22 октября) и вынужденного покоя (28 февраля).

Светлые столбики – обычная береза, темные столбики – карельская береза. АпИнв – апопластная инвертаза, Гл – глюкоза, Сах – сахароза, Фр – фруктоза

накапливаться во флоэмной паренхиме березы повислой и, следовательно, не выполняет здесь функцию запасного метаболита.

Установлено, что из всех расщепляющих сахарозу ферментов в период вегетации самая высокая активность во флоэме принадлежала апопластной инвертазе (см. табл.). Из этого можно заключить, что во флоэме березы в это время постоянно имеет место транспорт сахарозы из симпласта в апопласт.

В апреле активность АпИнв во флоэме была наибольшей (см. табл.). В это время сахароза в стволе древесных растений образуется в результате гидролиза крахмала [Cortes, Sinclair, 1985; Essiamah, Eschrich, 1985]. Для обычной и карельской березы это хорошо показано в работе Л. А. Барильской [1978]. Известно, что массовый гидролиз крахмала происходит при температурах от 0 до 5 °C [Sauter, Kloth, 1987]. Температура в период отбора образцов была +4 °C, т. е. способствовала расщеплению этого полисахарида. Наибольшее количество крахмала сосредоточено в паренхимных клетках коры. Распад сахарозы во флоэме под действием АпИнв на глюкозу и фруктозу создает высокий градиент ее концентрации, который поддерживает направленный поток дисахарида из периферийных слоев коры в сторону ксилемы (рис. 5).

У карельской березы весной наблюдалось меньшее содержание сахарозы во флоэме, чем у обычной березы (см. рис. 3). Причина этого, очевидно, кроется в намного более высокой у нее (в 3,9 раза) активности апопластной инвертазы (см. табл.). В это время гексозы, образующиеся во флоэме в результате расщепления сахарозы, оттекают в сосуды ксилемы, по которым поднимаются к набухающим почкам (см. рис. 5). Из этого следует, что активность АпИнв должна коррелировать с содержанием моносахаров в ксилемном соке. На рис. 2 видно, что уровень гексоз в ксилемном соке карельской березы был существенно выше, чем у обычной березы повислой. Во многих работах показано, что накопление глюкозы и фруктозы оказывает ингибирующее действие на инвертазу [Glasziou et al., 1967; Lopez et al., 1988; Isla et al., 1991; Burch et al., 1992; Zhang, Wang, 2002], а их удаление способствует поддержанию активности фермента. Из сказанного можно заключить, что максимум активности АпИнв во флоэме в апреле обусловлен оттоком продуктов реакции в ксилему и далее в направлении пробуждающейся кроны. Обобщение полученных в начале вегетации данных позволяет заключить, что весной практически весь пул сахарозы тканей ствола находится в движении:

сахароза транспортируется из более периферических слоев коры во флоэму, где интенсивно расщепляется апопластной инвертазой. Высокая аттрагирующая сила почек обеспечивает быстрое удаление моносахаров в сосуды ксилемы. В результате высокая активность фермента и, следовательно, высокая интенсивность направленного транспорта сахарозы сохраняются в течение продолжительного времени.

В период активного вторичного роста (июнь–июль) сахароза поступает в ткани ствола из фотосинтезирующих листьев. Нисходящий поток сахарозы идет по специализированным каналам дальнего транспорта – ситовидным трубкам проводящей флоэмы. Основным акцептором сахарозы в это время служит камбиальная зона, некоторая часть сахарозы попадает в более периферийные по отношению к проводящей флоэме слои коры (см. рис. 5). В норме разгрузка сахарозы из ситовидных трубок и движение ее к камбиальной зоне происходят по симпласту [Fisher, Oparka, 1996; Oparka, Santa Cruz, 2000]. Это значит, что сахароза движется к камбию по каналам эндоплазматической сети, переходя из клетки в клетку по плазмодесмам [Гамалей, 2004]. Наличие интенсивного симпластного потока ограничивает выход сахарозы в апопласт клеток флоэмы, поэтому активность АпИнв во флоэме исследуемых берез в июне в несколько раз ниже по сравнению с апрелем (см. табл.).

Для обычной березы характерно интенсивное использование сахарозы в процессе формирования древесины, у карельской березы, напротив, метаболизация сахарозы в ксилемной части камбиальной зоны существенно ниже [Галибина и др., 2015а]. Более слабая утилизация сахарозы в ходе ксилогенеза замедляет ее отток из флоэмы. Следствием этого может стать появление во флоэме «лишней» (не используемой в ходе деятельности камбия) сахарозы, результатом чего, в свою очередь, станет уменьшение градиента ее концентрации и ухудшение донорно-акцепторных отношений в системе «лист–ствол». У карельской березы сахароза во флоэме не накапливается в связи с высокой активностью апопластной и вакуолярной инвертаз (см. табл.). Расщепление большого количества сахарозы в апопласте и вакуолях паренхимных клеток способствует уменьшению концентрации дисахарида во флоэме этого древесного растения до уровня даже более низкого, чем у обычной березы (см. рис. 3, 5).

Исходя из представленных данных можно сделать вывод, что в период камбиального роста пул сахарозы во флоэме исследуемых берез существует в виде четырех основных потоков:

(1) нисходящего потока сахарозы в русле ее дальнего транспорта по ситовидным трубкам, (2) радиального межклеточного потока по каналам эндоплазматической сети клеток паренхимы в сторону формирующейся ксилемы, (3) потока сахарозы из клеток паренхимы во внеклеточное пространство, где она расщепляется апопластной инвертазой, (4) потока сахарозы в вакуоли паренхимных клеток, где она расщепляется вакуолярной инвертазой.

На рис. 4 показано распределение сахарозы и продуктов ее расщепления среди слоев тканей ствола во второй половине периода камбиального роста (28 июля). В это время следовало ожидать наиболее высокого уровня сахарозы в слое проводящей флоэмы, в состав которой входят ситовидные трубки – специализированные каналы дальнего транспорта ассимилятов. Однако самая высокая концентрация дисахарида у обеих форм березы была обнаружена в камбиальной зоне. Объяснение этому факту может быть следующее: представленные данные отражают содержание сахарозы во всем комплексе структурных элементов проводящей флоэмы, где, помимо ситовидных трубок, находится значительная часть клеток паренхимы, в апопласте и вакуолях которых идет интенсивное расщепление сахарозы (см. табл.). Камбиальная зона в период ксилогенеза является мощным акцептором сахарозы, поэтому ее относительно высокий уровень здесь понятен. Акцепторная сила непроводящей флоэмы, по сравнению с камбиальной зоной, намного ниже, поэтому чем дальше к периферии от проводящей флоэмы, тем слабее должен быть поток сахарозы. Это находит отражение в более низком содержании сахарозы в непроводящей флоэме и ее следовых количествах в феллодерме. Сравнительно низкий уровень сахарозы в ксилеме можно связать со снабжением этой ткани по остаточному принципу после камбиальной зоны, клетки которой в период вторичного роста перехватывают основное количество дисахарида. Представленные данные показывают, что количество сахарозы в тканях ствола коррелирует с их акцепторной силой. Последняя определяет направление и интенсивность оттока сахарозы из проводящей флоэмы.

Глюкоза имеет очень высокую метаболическую активность и в зонах интенсивного роста, как правило, не накапливается. Фруктоза входит в метаболические процессы медленнее по сравнению с глюкозой, поэтому в местах активного использования сахарозы содержание фруктозы обычно увеличивается. В данной связи накопление в тканях фруктозы многие авторы рассматривают в качестве индикатора активных

ростовых процессов [Софронова, 1985; Uggla et al., 2001; Magel et al., 2006]. Поскольку у обеих берез в июле камбий продолжал формирование древесины, то высокое содержание фруктозы в камбиальной зоне (см. рис. 4) представляет собой нормальное явление. Причем более низкий уровень фруктозы у карельской березы коррелирует с меньшей интенсивностью ксилогенеза по сравнению с обычной березой повислой. Важной особенностью карельской березы является большой пик фруктозы в проводящей флоэме (см. рис. 4). Исходя из сказанного выше, это может свидетельствовать о том, что при формировании структурных аномалий древесины активные ростовые процессы наблюдаются не только в камбиальной зоне, но и во флоэме. Данный вывод согласуется с результатами наших микроскопических и биохимических исследований [Novitskaya, Kushnir, 2006; Новицкая, 2008; Галибина и др., 2015а, б]. Аккумуляция большого количества фруктозы в тканях в период деятельности камбия свидетельствует о том, что она временно не участвует в метаболических реакциях. И если сахароза в это время выполняет функцию транспортировки углеводов, то фруктоза, очевидно, выступает в качестве лабильного запаса сахаров.

В октябре, когда листья уже опали, наличие сахарозы в паренхимных клетках тканей ствола является типичным для листовых древесных пород и связано с гидролизом крахмала в ответ на понижение температуры [Sauter, Kloth, 1987; Sauter, van Cleve, 1994; Kasuga et al., 2007; Yamada et al., 2011]. В осенний срок фиксации температура воздуха колебалась от +6 до +1 °С, т. е. соответствовала указанному ранее температурному диапазону, при котором крахмал превращается в сахар. В октябре АпИнв была более активной, чем в июне (у обычной березы в 1,3 и у карельской березы в 2,1 раза) (см. табл.), что указывает на выход большего количества сахарозы в апопласт. Причина этого, скорее всего, связана с невозможностью удаления сахаров из клеток по симпласту (при температуре ниже 8 °С плазмодесмы закрыты) [Гамалей, 2004]. В октябре гексозы, образующиеся в апопласте, возвращаются в клетку, где они через гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и пентозофосфатный путь используются для синтеза запасных веществ неуглеводной природы [Курсанов, 1976; Roitsch et al., 1995; Koch, 1996]. Освобождение апопласта от глюкозы и фруктозы в результате их переноса в клетку через плазмолемму происходит намного медленнее, чем при весеннем оттоке моносахаров с ксилемным соком. Можно предположить, что причиной примерно в два раза более низкой

активности апопластной инвертазы в октябре, по сравнению с апрелем (см. табл.), явилось подавление фермента продуктами реакции. У карельской березы осенью активность АпИнв во флоэме была в 4 раза выше, чем у обычной березы, что коррелирует с намного меньшим содержанием у нее сахарозы (см. рис. 3, 5). С точки зрения транспорта веществ высокая активность АпИнв в октябре свидетельствует об интенсивном потоке сахарозы из внутриклеточного пространства в апопласт.

В феврале исследуемые деревья находились в состоянии вынужденного покоя. В день отбора проб температура воздуха была –10 °С. При низких температурах транспорт и обмен веществ сильно заторможены. Содержание сахарозы во флоэме зимой у обеих берез близко к нулю (см. рис. 3, 5). Это указывает на тесную взаимосвязь между транспортными процессами и наличием сахарозы в ткани и подтверждает ее транспортную функцию.

Во флоэме карельской березы наряду с сахарозой в феврале определяли также концентрацию глюкозы и фруктозы. Уровень фруктозы в данном случае превосходил содержание глюкозы в 4 раза. Наличие достаточно большого количества фруктозы во флоэме в период покоя указывает на то, что она у березы является запасным сахаром. При отрицательных температурах сахара в тканях древесных растений выполняют криопротекторную функцию, причем основной сахар, связанный с морозостойкостью растения, у разных видов может быть разным [Lee et al., 2012]. В морозостойкости тканей ствола, например, осины и дуба важную роль играют моносахара – глюкоза и фруктоза [Cox, Stushnoff, 2001; Morin et al., 2007]. Исходя из полученных нами данных можно сделать вывод, что зимой у березы повислой фруктоза совмещает в себе функции запасного соединения и криопротектора.

Заключение

В ходе исследований установлено, что у карельской березы, как и у обычной березы, сахароза является основной транспортной формой углеводов.

В период вегетации во флоэме обеих берез была отмечена активность всех ферментов, расщепляющих сахарозу, – АпИнв, ВакИнв, ЦитИнв и СС. Высокая активность вакуолярной инвертазы (50–91 % суммарной активности внутриклеточных ферментов) свидетельствует о том, что в ткани исследуемых растений сахароза не может выполнять роль запасного метаболита, поскольку в запасующем сахара пространстве клеток (вакуолях) распадается на глюкозу и фруктозу.

Обобщение данных по активности ферментов показало, что в период вегетации сахараза во флоэме березы находится в постоянном движении к зонам ее расщепления, главными из которых являются апопласт и вакуоли клеток флоэмной паренхимы и камбиальная зона, поэтому весь пул сахарозы во флоэме можно рассматривать как транспортную сахарозу. Транспортная функция сахарозы подчеркивается отсутствием дисахарида в клетках березы при зимних отрицательных температурах, когда метаболические процессы и передвижение веществ в растении сильно заторможены.

В ходе вторичного утолщения ствола в камбиальной зоне обеих форм березы и во флоэме карельской березы накапливается большое количество фруктозы. Это свидетельствует о том, что в период деятельности камбия часть фруктозы, образующейся при расщеплении сахарозы, временно не используется в метаболических реакциях и, следовательно, выполняет функцию лабильного резерва. Относительно высокий уровень фруктозы в клетках флоэмы березы в период зимнего покоя подтверждает ее запасную функцию и указывает на то, что при отрицательных температурах она выполняет также роль криопротектора.

Авторы выражают благодарность И. Н. Софроновой за помощь в проведении биохимических анализов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института леса КарНЦ РАН.

Литература

Барильская Л. А. Сравнительный структурный анализ древесины березы повислой и карельской березы: дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 1978. 157 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. и др. Активность пероксидазы в органах и тканях деревьев березы повислой // Ученые записки ПетрГУ. Серия Естественные и технические науки. 2013. Т. 133, № 4. С. 7–13.

Галибина Н. А., Терехова Е. Н., Новицкая Л. Л., Софронова И. Н. Динамика неструктурных углеводов в органах и тканях двухлетних сеянцев *Betula pendula* и *Betula pubescence* в период вегетации // Труды КарНЦ РАН. 2014. № 5. С. 108–116.

Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Красавина М. С., Мощенская Ю. Л. Активность сахарозосинтазы в тканях ствола карельской березы в период камбиально-

го роста // Физиология растений. 2015а. Т. 62, № 3. С. 410–419. doi: 10.7868/S0015330315030057.

Галибина Н. А., Новицкая Л. Л., Красавина М. С., Мощенская Ю. Л. Активность инвертазы в тканях ствола карельской березы // Физиология растений. 2015б. Т. 62, № 6. С. 804–813. doi: 10.7868/S0015330315060068.

Галибина Н. А., Терехова Е. Н. Физико-химические свойства клеточных стенок тканей ствола деревьев *Betula pendula* Roth // Ученые записки ПетрГУ. Серия Естественные и технические науки. 2014. № 4. С. 19–25.

Гамалей Ю. В. Транспортная система сосудистых растений. СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского университета, 2004. 422 с.

Колесниченко В. М. Динамика содержания и превращения ассимилятов у древесных растений: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Воронеж, 1985. 22 с.

Курсанов А. Л. Транспорт ассимилятов в растении. М.: Наука, 1976. 646 с.

Любавская А. Я. Карельская береза. М.: Лесная промышленность, 1978. 158 с.

Новицкая Л. Л. О возможной причине формирования структурных аномалий ствола карельской березы // Бот. журн. 1997. Т. 82, № 9. С. 61–66.

Новицкая Л. Л. О механизмах формирования структурных аномалий ствола карельской березы // Лесоведение. 1999. № 4. С. 77–80.

Новицкая Л. Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.

Орлов И. И. Подсочка березы и клена. Свердловск: Свердловское книжное издательство, 1963. 40 с.

Софронова Г. И. Углеводный обмен // Физиолого-биохимические основы роста и адаптации сосны на Севере / Ред. З. Ф. Сычева. Ленинград: Наука, 1985. С. 30–57.

Энгель О. С., Холодова В. П. Активность инвертазы и отложение сахарозы в корнях сахарной свеклы // Физиол. раст. 1969. Т. 16, вып. 6. С. 973–980.

Burch L. R., Davies H. V., Cuthbert E. M. et al. Purification of soluble invertase from potato // Phytochemistry. 1992. Vol. 31. P. 1901–1904. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00107-9.

Cortes P. M., Sinclair T. R. The role of osmotic potential in spring sap flow of mature sugar maple trees (*Acer saccharum* Marsh) // J. Exp. Bot. 1985. Vol. 36. P. 12–24. doi: 10.1093/jxb/36.1.12.

Cox S. E., Stushnoff C. Temperature-related shifts in soluble carbohydrate content during dormancy and cold acclimation in *Populus tremuloides* // Can. J. For. Res. 2001. Vol. 31. P. 730–737. doi: 10.1139/x00-206.

Essiamah S., Eschrich W. Changes of starch content in the storage tissues of deciduous trees during winter and spring // IAWA Bulletin n. s. 1985. Vol. 6. P. 97–106.

Fisher D. B., Oparka K. J. Post-phloem transport: principles and problems // J. Exp. Bot. 1996. Vol. 47. P. 1141–1154.

Gibson S. I. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web // Plant Physiol. 2000. Vol. 124. P. 1532–1539. doi: 10.1104/124.4.1532.

Gibson S. I. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network // J. Exp. Bot. 2004. Vol. 55. P. 253–264. doi: 10.1093/jxb/erh048.

- Glasziou K. T., Waldron J. C., Most B. H.* Glucose regulation of enzyme synthesis in sugar cane stem tissue // *Phytochemistry*. 1967. Vol. 6. P. 769–775. doi: 10.1016/S0031-9422(00)86021-5.
- Graham I. A.* Carbohydrate control of gene expression in higher plants // *Res. Microbiology*. 1996. Vol. 147. P. 572–580. doi: 10.1016/0923-2508(96)84014-9.
- Hatch M. D., Glasziou K. T.* Sugar accumulation cycle in sugar-cane. II. Relationship of invertase activity to sugar content and growth rate in storage tissue of plant grown in controlled environments // *Plant Physiol*. 1963. Vol. 38. P. 344–348.
- Isla M. I., Vattuone M. A., Sampietro A. R.* Modulation of potato invertase activity by fructose // *Phytochemistry*. 1991. Vol. 30. P. 423–426. doi: 10.1016/0031-9422(91)83697-J.
- Kasuga J., Arakawa K., Fujikawa S.* High accumulation of soluble sugars in deep supercooling Japanese white birch xylem parenchyma cells. *New Phytol*. 2007. Vol. 174. P. 569–579. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02025.x.
- Kennecke M., Ziegler H., de Fekete M. A. R.* Enzymaktivitäten im Siebröhrensaft von *Robinia pseudoacacia* L. und anderer Baumarten // *Planta*. 1971. Vol. 98. S. 330–356.
- Koch K. E.* Carbohydrate-modulated gene expression in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 1996. Vol. 47. P. 509–540. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.509.
- Lee J. H., Yu D. J., Kim S. J. et al.* Intraspecies differences in cold hardiness, carbohydrate content and β -amylase gene expression of *Vaccinium corymbosum* during cold acclimation and deacclimation // *Tree Physiology*. 2012. Vol. 32, iss. 12. P. 1533–1540. doi: 10.1093/treephys/tps102.
- Lopez M. E., Vattuone M. A., Sampietro A. R.* Partial purification and properties of invertase from *Carica papaya* fruits // *Phytochemistry*. 1988. Vol. 27. P. 3077–3081. doi: 10.1016/0031-9422(88)80004-9.
- Loreti E., De Bellis L., Alpi A., Perata P.* Why and how do plant cells sense sugars // *Ann. Bot*. 2001. Vol. 88. P. 803–812. doi: 10.1006/anbo.2001.1526.
- Magel E., Kruse S., Lütje G., Liese W.* Soluble carbohydrates and acid invertases involved in the rapid growth of developing culms in *Sasa palmata* (Bean) Camus // *Bamboo Science and Culture: J. Amer. Bamboo Soc*. 2006. Vol. 19, No 1. P. 23–29.
- Morin X., Ameglio T., Ahas R. et al.* Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species // *Tree Physiol*. 2007. Vol. 27. P. 817–825. doi: 10.1093/treephys/27.6.817.
- Novitskaya L. L.* Regeneration of bark and formation of abnormal birch wood // *Trees*. 1998. Vol. 13. P. 74–79. doi: 10.1007/s004680050189.
- Novitskaya L. L., Kushnir F. V.* The role of sucrose in regulation of trunk tissue development in *Betula pendula* Roth // *J. Plant Growth Regul*. 2006. Vol. 25. P. 18–29. doi: 10.1007/s00344-004-0419-2.
- Oparka K. J., Santa Cruz S.* The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 2000. Vol. 51. P. 323–347. doi: 10.1146/annurev.arplant.51.1.323.
- Roitsch T., Bittner M., Godt D. E.* Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation // *Plant Physiol*. 1995. Vol. 108. P. 285–294. doi: 10.1104/pp.108.1.285.
- Sauter J. J., Kloth S.* Changes in carbohydrates and ultrastructure in xylem ray cells of populus in response to chilling // *Protoplasma*. 1987. Vol. 137. P. 45–55. doi: 10.1007/BF01281175.
- Sauter J. J., van Cleve B.* Storage, mobilization and interrelations of starch, sugars, protein and fat on the ray storage tissue of poplar trees // *Trees*. 1994. Vol. 8. P. 297–304. doi: 10.1007/BF00202674.
- Sheen J., Zhou L., Jang J. C.* Sugars as signalling molecules // *Curr. Opin. Plant Biol*. 1999. Vol. 2. P. 410–418. doi: 10.1016/S1369-5266(99)00014-X.
- Smeekens S.* Sugar regulation of gene expression in plants // *Curr. Opin. Plant Biol*. 1998. Vol. 1. P. 230–234. doi: 10.1016/S1369-5266(98)80109-X.
- Uggla C., Magel E., Moritz T., Sundberg B.* Function and dynamics of auxin and carbohydrates during earlywood/latewood transition in Scots pine // *Plant Physiol*. 2001. Vol. 125. P. 2029–2039. doi: 10.1104/pp.125.4.2029.
- Yamada Y., Awano T., Fujita M., Takabe K.* Living wood fibers act as large-capacity «single-use» starch storage in black locust (*Robinia pseudoacacia*) // *Trees*. 2011. Vol. 25. P. 607–616. doi: 10.1007/s00468-010-0537-3.
- Zhang D., Wang Y.* Post-translational inhibitory regulation of acid invertase induced by fructose and glucose in developing apple fruit // *Science in China. Series C: Life Sciences*. 2002. Vol. 45. P. 309–321. doi: 10.1360/02yc9034.
- Zimmermann M. H., Ziegler H.* List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates // In: Zimmermann M. H., Milburn J. A. (eds.) *Encyclopedia of Plant Physiology, NS, Vol. 1. Transport in Plants: Phloem Transport*. Springer, New York, P. 480–503.

Поступила в редакцию 25.06.2015

References

Baril'skaya L. A. Sravnitel'nyi strukturnyi analiz drevesiny berezy povisloi i karel'skoi breezy [Comparative analysis of common silver birch and Karelian birch wood structure]: dis. ... kand. biol. nauk [PhD Diss. (Biol.)]. Petrozavodsk, 1978. 157 p.

Galibina N. A., Novitskaya L. L., Sofronova I. N. Dinamika sakharov v tkanyakh stvola *Betula pendula* (Betulaceae) pri vykhode iz zimnego pokoya [Dynamics of sugars in trunk tissues of *Betula pendula* (Betulaceae) during dormancy breaking]. *Rastitel'nye*

resursy [Plant resources]. 2012. Vol. 48, No 4. P. 554–564.

Galibina N. A., Tselishcheva Yu. L., Andreev V. P., Sofronova I. N., Nikerova K. M. Aktivnost' peroksidazy v organakh i tkanyakh derev'ev berezy povisloi [Peroxidase activity in organs and tissues of silver birch]. *Uchenye zapiski PetrGU. Seriya Estestvennyye i tekhnicheskije nauki [Proceedings of PetrSU. Ser. Natural and engineering sciences]*. 2013. Vol. 133, No 4. P. 7–13.

Galibina N. A., Terebova E. N., Novitskaya L. L., Sofronova I. N. Dinamika nestrukturnykh uglevodov v organakh i tkanyakh dvukhletnykh seyantsev *Betula pendula* i *Betula pubescence* v period vegetatsii [Dynamics of nonstructural carbohydrates in organs and tissues of two-year-old seedlings of *Betula pendula* and *Betula pubescence* during the growing season]. *Trudy KarNTs RAN [Transactions of KarRC RAS]*. 2014. No 5. P. 108–116.

Galibina N. A., Novitskaya L. L., Krasavina M. S., Moshchenskaya Yu. L. Aktivnost' sakharozosintazy v tkanyakh stvola karel'skoi berezy v period kambial'nogo rosta [Activity of sucrose synthase in trunk tissues of Karelian birch during cambial growth]. *Fiziologiya rastenii [Russian Journal of Plant Physiology]*. 2015a. Vol. 62, No 3. P. 410–419. doi: 10.7868/S0015330315030057.

Galibina N. A., Novitskaya L. L., Krasavina M. S., Moshchenskaya Yu. L. Aktivnost' invertazy v tkanyakh stvola karel'skoi berezy [Invertase activity in trunk tissues of Karelian birch]. *Fiziologiya rastenii [Russian Journal of Plant Physiology]*. 2015b. Vol. 62, No 6. P. 804–813. doi: 10.7868/S0015330315060068.

Galibina N. A., Terebova E. N. Fiziko-khimicheskie svoistva kletochnykh stenok tkanei stvola derev'ev *Betula pendula* Roth [Physical-chemical properties of *Betula pendula* Roth trunk tissue cell walls]. *Uchenye zapiski PetrGU. Seriya Estestvennyye i tekhnicheskije nauki [Proceedings of PetrSU. Ser. Natural and engineering sciences]*. 2014. No 4. P. 19–25.

Gamalei Yu. V. Transportnaya sistema sosudistykh rastenii [Transport system of vascular plants]. St. Petersburg: St. Petersburg university, 2004. 422 p.

Kolesnichenko V. M. Dinamika soderzhaniya i prevrashcheniya assimilyatov u drevesnykh rastenii [Dynamics of assimilate content and transformation in woody plants]: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk [PhD Diss. (Biol.)]. Voronezh, 1985. 22 p.

Kursanov A. L. Transport assimilyatov v rastenii [Assimilate transport in plants]. Moscow: Nauka, 1976. 646 p.

Lyubavskaya A. Ya. Karel'skaya bereza [Karelian birch]. Moscow: Lesnaya promyshlennost', 1978. 158 p.

Novitskaya L. L. O vozmozhnoi prichine formirovaniya strukturnykh anomalii stvola karel'skoi berezy [On probable causes of structural anomalies of wood in Karelian birch]. *Bot. zhurn.* 1997. Vol. 82, No 9. P. 61–66.

Novitskaya L. L. O mekhanizmach formirovaniya strukturnykh anomalii stvola karel'skoi berezy [Mechanisms of formation of structural abnormalities of wood in Karelian birch]. *Lesovedenie [Forestry]*. 1999. No 4. P. 77–80.

Novitskaya L. L. Karel'skaya bereza: mekhanizmy rosta i razvitiya strukturnykh anomalii [Karelian birch. Mechanism of growth and development of structural abnormalities]. Petrozavodsk: Verso, 2008. 144 p.

Orlov I. I. Podsochka berezy i klena [Tapping birch and maple trees]. Sverdlovsk: Sverdlovskoe knizhnoe izdatel'stvo, 1963. 40 p.

Sofronova G. I. Uglevodnyi obmen [Metabolism of carbohydrates]. *Fiziologo-biokhimicheskie osnovy rosta i adaptatsii sosny na Severe* [Physiological and biochemical basics of pine growth and adaptation in northern regions] / Red. Z. F. Sycheva. Leningrad: Nauka, 1985. P. 30–57.

Burch L. R., Davies H. V., Cuthbert E. M., Marchray G. C., Hyedley P., Waugh R. Purification of soluble invertase from potato. *Phytochemistry*. 1992. Vol. 31. P. 1901–1904. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00107-9.

Cortes P. M., Sinclair T. R. The role of osmotic potential in spring sap flow of mature sugar maple trees (*Acer saccharum* Marsh). *J. Exp. Bot.* 1985. Vol. 36. P. 12–24. doi: 10.1093/jxb/36.1.12.

Cox S. E., Stushnoff C. Temperature-related shifts in soluble carbohydrate content during dormancy and cold acclimation in *Populus tremuloides*. *Can. J. For. Res.* 2001. Vol. 31. P. 730–737. doi: 10.1139/x00-206.

Essiamah S., Eschrich W. Changes of starch content in the storage tissues of deciduous trees during winter and spring. *IAWA Bulletin n. s.* 1985. Vol. 6. P. 97–106.

Fisher D. B., Oparka K. J. Post-phloem transport: principles and problems. *J. Exp. Bot.* 1996. Vol. 47. P. 1141–1154.

Gibson S. I. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol.* 2000. Vol. 124. P. 1532–1539. doi: 10.1104/124.4.1532.

Gibson S. I. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J. Exp. Bot.* 2004. Vol. 55. P. 253–264. doi: 10.1093/jxb/erh048.

Glasziou K. T., Waldron J. C., Most B. H. Glucose regulation of enzyme synthesis in sugar cane stem tissue. *Phytochemistry*. 1967. Vol. 6. P. 769–775. doi: 10.1016/S0031-9422(00)86021-5.

Graham I. A. Carbohydrate control of gene expression in higher plants. *Res. Microbiology*. 1996. Vol. 147. P. 572–580. doi: 10.1016/0923-2508(96)84014-9.

Hatch M. D., Glasziou K. T. Sugar accumulation cycle in sugar-cane. II. Relationship of invertase activity to sugar content and growth rate in storage tissue of plant grown in controlled environments. *Plant Physiol.* 1963. Vol. 38. P. 344–348.

Isla M. I., Vattuone M. A., Sampietro A. R. Modulation of potato invertase activity by fructose. *Phytochemistry*. 1991. Vol. 30. P. 423–426. doi: 10.1016/0031-9422(91)83697-J.

Kasuga J., Arakawa K., Fujikawa S. High accumulation of soluble sugars in deep supercooling Japanese white birch xylem parenchyma cells. *New Phytol.* 2007. Vol. 174. P. 569–579. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02025.x.

Kennecke M., Ziegler H., de Fekete M. A. R. Enzymaktivitäten im Siebröhrensaft von *Robinia pseudoacacia* L. und anderer Baumarten. *Planta*. 1971. Vol. 98. P. 330–356.

Koch K. E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996. Vol. 47. P. 509–540. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.509.

Lee J. H., Yu D. J., Kim S. J., Choi D., Lee H. J. Intraspecific differences in cold hardiness, carbohydrate

content and β -amylase gene expression of *Vaccinium corymbosum* during cold acclimation and deacclimation. *Tree Physiology*. 2012. Vol. 32, iss. 12. P. 1533–1540. doi: 10.1093/treephys/tps102.

Lopez M. E., Vattuone M. A., Sampietro A. R. Partial purification and properties of invertase from *Carica papaya* fruits. *Phytochemistry*. 1988. Vol. 27. P. 3077–3081. doi: 10.1016/0031-9422(88)80004-9.

Loreti E., De Bellis L., Alpi A., Perata P. Why and how do plant cells sense sugars. *Ann. Bot.* 2001. Vol. 88. P. 803–812. doi: 10.1006/anbo.2001.1526.

Magel E., Kruse S., Lütje G., Liese W. Soluble carbohydrates and acid invertases involved in the rapid growth of developing culms in *Sasa palmata* (Bean) Camus. *Bamboo Science and Culture: J. Amer. Bamboo Soc.* 2006. Vol. 19, No 1. P. 23–29.

Morin X., Ameglio T., Ahas R., Kurz-Besson C., Lanta V., Lebourgeois F., Miglietta F., Chuine I. Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiol.* 2007. Vol. 27. P. 817–825. doi: 10.1093/treephys/27.6.817.

Novitskaya L. L. Regeneration of bark and formation of abnormal birch wood. *Trees*. 1998. Vol. 13. P. 74–79. doi: 10.1007/s004680050189.

Novitskaya L. L., Kushnir F. V. The role of sucrose in regulation of trunk tissue development in *Betula pendula* Roth. *J. Plant Growth Regul.* 2006. Vol. 25. P. 18–29. doi: 10.1007/s00344-004-0419-2.

Oparka K. J., Santa Cruz S. The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2000. Vol. 51. P. 323–347. doi: 10.1146/annurev.arplant.51.1.323.

Roitsch T., Bittner M., Godt D. E. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression

suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol.* 1995. Vol. 108. P. 285–294. doi: 10.1104/pp.108.1.285.

Sauter J. J., Kloth S. Changes in carbohydrates and ultrastructure in xylem ray cells of populus in response to chilling. *Protoplasma*. 1987. Vol. 137. P. 45–55. doi: 10.1007/BF01281175.

Sauter J. J., van Cleve B. Storage, mobilization and interrelations of starch, sugars, protein and fat on the ray storage tissue of poplar trees. *Trees*. 1994. Vol. 8. P. 297–304. doi: 10.1007/BF00202674.

Sheen J., Zhou L., Jang J. C. Sugars as signalling molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1999. Vol. 2. P. 410–418. doi: 10.1016/S1369-5266(99)00014-X.

Smeekens S. Sugar regulation of gene expression in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1998. Vol. 1. P. 230–234. doi: 10.1016/S1369-5266(98)80109-X.

Uggla C., Magel E., Moritz T., Sundberg B. Function and dynamics of auxin and carbohydrates during early-wood/latewood transition in Scots pine. *Plant Physiol.* 2001. Vol. 125. P. 2029–2039. doi: 10.1104/pp.125.4.2029.

Yamada Y., Awano T., Fujita M., Takabe K. Living wood fibers act as large-capacity «single-use» starch storage in black locust (*Robinia pseudoacacia*). *Trees*. 2011. Vol. 25. P. 607–616. doi: 10.1007/s00468-010-0537-3.

Zhang D., Wang Y. Post-translational inhibitory regulation of acid invertase induced by fructose and glucose in developing apple fruit. *Science in China. Series C: Life Sciences*. 2002. Vol. 45. P. 309–321. doi: 10.1360/02yc9034.

Zimmermann M. H., Ziegler H. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: Zimmermann M. H., Milburn J. A. (eds.) *Encyclopedia of Plant Physiology, NS, Vol. 1. Transport in Plants: Phloem Transport*. Springer, New York, P. 480–503.

Received June 25, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Новицкая Людмила Людвиговна

зав. лаб. физиологии и цитологии древесных растений,
д. б. н.

Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910

эл. почта: novits@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 568216

Галибина Наталия Алексеевна

зав. аналитической лабораторией, к. б. н.

Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910

эл. почта: galibina@krc.karelia.ru

тел.: (8142) 768160

Никерова Ксения Михайловна

старший химик аналитической лаборатории

Институт леса Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910

эл. почта: knikerova@yandex.ru

тел.: (8142) 768160

CONTRIBUTORS:

Novitskaya, Lyudmila

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: novits@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 568216

Galibina, Nataliya

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

Nikerova, Kseniya

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: knikerova@yandex.ru
tel.: (8142) 768160

УДК 579.68

ОЦЕНКА ВСТРЕЧАЕМОСТИ АУКСОТРОФНЫХ ВАРИАНТОВ *ESCHERICHIA COLI* В НЕКОТОРЫХ ВОДОЕМАХ КАРЕЛИИ

Н. А. Сидорова¹, Е. А. Зацаринная²

¹ Петрозаводский государственный университет

² Рязанский государственный университет имени С. А. Есенина

Проведено изучение потребностей в факторах роста (ауксотрофности) у 199 изолятов *Escherichia coli*, выделенных из ряда водных объектов Карелии, которые отличаются типом и интенсивностью антропогенного воздействия. Установлено, что ауксотрофные варианты эшерихий встречаются во всех обследованных водоемах. Минимальное количество *E. coli*, нуждающихся в факторах роста, зафиксировано в центральной части Онежского озера. Отмечена зависимость встречаемости ауксотрофов от уровня поступления загрязняющих органических веществ. В водоемах, испытывающих интенсивную антропогенную нагрузку, большинство изолятов обладали множественной ауксотрофностью. При культивировании выделенных изолятов *E. coli* обнаружены ауксотрофные варианты практически по всем аминокислотам. Полученные результаты позволяют объективно оценивать состояние природных сообществ микроорганизмов в контексте процессов естественного самоочищения поверхностных водоемов.

Ключевые слова: ауксотрофность; *Escherichia coli*; аминокислоты; микробиологическая оценка водных объектов.

N. A. Sidorova, E. A. Zatsarinnaya. ASSESSMENT OF AUXOTROPHIC *ESCHERICHIA COLI* OCCURRENCE IN SOME KARELIAN RESERVOIRS

The study of nutrient requirements of growth promoting factors was carried among 199 *Escherichia coli* species isolated from a series of water reservoirs in Karelia differing in the type and intensity of anthropogenic load. Auxotrophic *E. coli* were found in all of the surveyed reservoirs. A minimal percentage of *E. coli* that require growth factors was observed in the central part of Lake Onega. It is noted that the occurrence of auxotrophs depends on the level of water pollution. Most isolates in the reservoirs under intense anthropogenic load were multiple auxotrophs. Auxotrophic variants were discovered in almost all amino acids during the cultivation of *E. coli* isolates. The obtained results enable us to assess the state of natural microbial communities more objectively in terms of self-purification of surface water bodies.

Keywords: Auxotrophy; *Escherichia coli*; amino acids; microbiological assessment of water reservoirs.

Введение

В последнее время все большее внимание уделяется распространению явления

потери биосинтетических генов у бактерий [Ochman, Moran, 2001; Koskiniemi et al., 2012; Lee, Marx, 2012; Куклева и др., 2013; D'Souza et al., 2014], которая приводит к формированию

ауксотрофности, т. е. неспособности к самостоятельному синтезу какого-либо фактора роста [Жуков-Вережников, Пехов, 1963]. Потребность экологически и эпидемически значимых микроорганизмов в аминокислотах, витаминах, а также азотистых основаниях давно используется для изучения генетики и таксономии прокариот [Иерусалимский, 1963; Класовский, Степанов, 1975; Пейсахис, Степанов, 1978]. Наиболее широко данный феномен представлен у молочнокислых бактерий [van de Guchte et al., 2006], эндосимбионтов [McCutcheon, Moran, 2007] и патогенов [Ochman, Moran, 2001; Куклева и др., 2013], существующих в богатых питательными веществами условиях. Однако биоинформационный анализ 949 секвенированных геномов, проведенный G. D'Souza и ее коллегами [2014], допускает появление зависимости от различных факторов роста у большинства (76 %) видов зубактерий. По мнению Giovannoni et al. [2005] и Morris et al. [2012], ауксотрофы имеют селективное преимущество – более высокую скорость достижения максимальной плотности популяции по сравнению с культурами дикого типа (прототрофами) при наличии необходимых аминокислот, витаминов либо азотистых оснований.

Так, штаммы *Escherichia coli*, представителя семейства *Enterobacteriaceae*, в период сапрофитической стадии существования не испытывают потребности в каких-либо факторах роста. Однако еще в 1946 г. E. L. Tatum и J. Lederberg выделили ауксотрофные варианты эшерихий [цит. по: Жуков-Вережников, Пехов, 1963]. Несмотря на то что исследованию генетических, биохимических и физиологических параметров *E. coli* посвящено множество отечественных и зарубежных исследований, особенностям формирования ауксотрофов этого вида в окружающей среде до сих пор уделяется недостаточно внимания [Пшеничнов, Колотвинов, 1986; Ihssen et al., 2007]. Причиной их распространения может являться не только обмен факторами роста бактерий в пределах одного микробного сообщества [D'Souza et al., 2014], но также увеличение содержания органических веществ в открытых водоемах [Münster, 1993].

В настоящей работе предпринимается попытка изучить явление ауксотрофности среди природных изолятов *E. coli*, выделенных из ряда водных объектов Республики Карелия.

Материалы и методы

Спектр ауксотрофности оценивался у природных изолятов *E. coli*, выделенных из проб бактериопланктона на семи станциях,

расположенных в акватории Петрозаводской и Кондопожской губы Онежского озера (станции 1 и 2), в центральной части озера – в районе острова Большой Клименецкий (ст. 3); рек Неглинка (ст. 4) и Лососинка (ст. 5); озера Каменный карьер (ст. 6) и Святозеро (ст. 7). Районы исследования отличаются по типу и интенсивности антропогенного воздействия (табл. 1).

Отбор проб воды проводили в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53415–2009 «Вода. Отбор проб для микробиологического анализа». Для выделения представителей семейства *Enterobacteriaceae* использовали общепринятый метод мембранной фильтрации на среде Эндо (ГОСТ 31955–2012 (ISO 9308–1:2000) «Вода питьевая. Обнаружение и количественный учет *Escherichia coli* и колиформных бактерий. Часть 1. Метод мембранной фильтрации»). В работе применялись мембранные фильтры из нитрата целлюлозы с диаметром пор 0,2 мкм («Владисарт», г. Владимир). Видовая идентификация *E. coli* проводилась с применением тестов, входящих в так называемую формулу ТИМАЦ [Санитарная микробиология..., 1969] с использованием наборов ускоренного микробиологического определения (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, г. Санкт-Петербург).

Ауксотрофные варианты *E. coli* идентифицировали по неспособности к росту на минимальной агаризованной среде [Clowes, Hayes, 1968]. Минимальный агар готовили из 300 мл 2%-го водяного агара, 100 мл солевого концентрата (NH_4Cl – 20 г, NH_4NO_3 – 4 г, Na_2SO_4 – 8 г, K_2HPO_4 – 12 г, KH_2PO_4 – 4 г, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,4 г, дистиллированная вода – 1000 мл) и 4 мл 20%-го раствора глюкозы. Пищевые потребности эшерихий определяли на минимальной среде аналогичного состава с различными комбинациями аминокислот [Clowes, Hayes, 1968]. В работе использовали 21 аминокислоту из 10 наборов. Среди них 16 протеиногенных аминокислот (аланин, цистеин, аргинин, глицин, аспарагин, аспарагиновая кислота, фенилаланин, валин, гистидин, глутамин, лейцин, лизин, метионин, серин, триптофан, цистеин), а также β -аланин, орнитин, β -фенил- β -аланин, норлейцин и норвалин. Концентрация аминокислот соответствовала 2 мг/мл. Все культуры эшерихий инкубировали при +37 °С в течение 24 часов. Ауксотрофность подтверждали, анализируя рост *E. coli* на минимальной среде указанного состава в присутствии необходимых факторов роста. Полиауксотрофными считали культуры, нуждающиеся в пяти и более факторах роста (аминокислотах).

Для оценки статистической значимости различий полученных результатов применяли

Таблица 1. Краткая характеристика антропогенного воздействия на анализируемые водные объекты [по данным Гос. докладов о состоянии окружающей среды в Республике Карелия 2010–2013; Онежское озеро, 1999; Теканова, Тимакова, 2007; Биоресурсы..., 2008; Ильмаст и др., 2008]

Водный объект	Основные источники антропогенного воздействия	Класс, разряд и характеристика загрязненности	Ингредиенты с превышением ПДК	Уровень сапробности водного объекта
Центральное Онего	Поступление веществ из загрязненных губ	1 – чистая		олигосапробный
Петрозаводская губа Онежского озера	Сточные воды городского коллектора, речной дренажный сток с урбанизированных и сельскохозяйственных территорий, ливневый сток, выпадения из атмосферы	2 – слабозагрязненная (в 2010 г. 3 «а» – загрязненная) II-III класс – умеренно загрязненная	ХПК, Cu, Fe _{общ} , БПК ₅	мезосапробный (в 2010 г. – β-мезосапробный)
Кондопожская губа Онежского озера	Промышленные воды целлюлозно-бумажного производства, коммунально-бытовые воды г. Кондопоги	III класс – умеренно загрязненная	БПК ₅ , Fe _{общ} , Mn, нефтепродукты	β-мезосапробный
р. Лососинка	Поверхностный сток с водосборной территории, ливневые канализационные стоки, стоки промышленных предприятий	3 «а» – загрязненная (в 2010 г. 4 «а» – грязная) II класс	ХПК, Cu, Fe _{общ} , БПК ₅ , нефть, NO ₂	β-мезосапробный
р. Неглинка	Поверхностный сток с водосборной территории, ливневые канализационные стоки, стоки промышленных предприятий	3 «б» – очень загрязненная (в 2010 г. 4 «а» – грязная и 4 «б» – очень грязная на разных створах) III-IV класс качества	ХПК, Cu, Fe _{общ} , БПК ₅ , нефть, NO ₂ рН – зафиксированы значения до 4,21	β-мезосапробный
оз. Каменный карьер	Поверхностный сток с водосборной территории	не определялся	-	олиготрофный
оз. Святозеро	Поверхностный сток с водосборной территории, коммунальные сточные воды п. Святозеро, форелевое хозяйство	-	БПК ₅ , ХПК, Fe _{общ}	мезосапробный

критерий χ^2 Пирсона [Ивантер, Коросов, 2000]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез $p = 0,05$.

Результаты и обсуждение

Питательные потребности в аминокислотах изучены у 199 культур *E. coli*. Ауксотрофные варианты выделены на всех станциях отбора проб бактериопланктона в количестве от 47 до 94 % от общего объема культур (табл. 2). Наименьшее количество ауксотрофов установлено для центральной части Онежского озера (47 %), подверженной менее интенсивному загрязнению, чем остальные водоисточники (см. табл. 1). 37 % ауксотрофных мутантов *E. coli* испытывали потребность в 1–4 аминокислотах, полиауксотрофность зафиксирована только для 10 % штаммов, дающих культуральный рост в присутствии 15 аминокислот из 21. Бактерии, выделенные в Петрозаводской и Кондопожской губах Онежского озера, испытывающих более интенсивную антропогенную нагрузку, чем центральная часть озера [Бояринов,

1992; Биоресурсы..., 2008], характеризовались высоким уровнем ауксотрофности (75 и 74 % соответственно). В Петрозаводской губе обнаружено 35 % культур, зависимых от 1–4 факторов роста, а в Кондопожской губе этот показатель приближался к 42 %. Полиауксотрофными оказались 45 % штаммов эшерихий в составе проб бактериопланктона Петрозаводской губы и 32 % – в составе проб Кондопожской губы.

Уровень ауксотрофности изолятов, выделенных из Неглинки, превышал 60 %, из них 30 % эшерихий были отнесены к полиауксотрофам. Культуры, нуждающиеся в присутствии одной аминокислоты, не обнаружены. В двух-трех аминокислотах нуждалось 32 % выделенных вариантов эшерихий. Максимальное количество необходимых аминокислот составило 16. Культуры *Escherichia coli*, обнаруженные в составе бактериопланктона реки Лососинки и озера Каменный карьер, оказались наиболее зависимы от факторов роста. 93 % эшерихий из реки Лососинки и 94 % из озера Каменный карьер идентифицированы как ауксотрофы. Причем если среди изолятов реки Лососинки

Таблица 2. Частота встречаемости ауксотрофных и полиауксотрофных вариантов от общего количества исследуемых изолятов

Исследуемый водный объект (количество изученных изолятов)	Количество ауксотрофов, %	Количество полиауксотрофных вариантов, %
Онежское озеро:		
Центральная часть (30)	47	10
Петрозаводская губа (20)	75	45
Кондопожская губа (38)	74	32
р. Лососинка (30)	93	87
р. Неглинка (20)	60	30
оз. Каменный карьер (32)	94	94
Святозеро (29)	83	79

Таблица 3. Частота встречаемости (%) питательных потребностей выделенных вариантов *Escherichia coli* в отдельных аминокислотах

Аминокислота	Станции отбора проб бактериопланктона						
	1	2	3	4	5	6	7
аланин	35	16	3	38	10	63	41
аргинин	20	16	7	42	40	75	34
глицин	15	16	3	42	20	75	38
аспарагин	30	16	3	42	30	81	41
аспарагиновая кислота	10	5	10	35	10	88	28
фенилаланин	10	5	13	50	20	88	55
валин	25	5	0	42	20	88	52
гистидин	10	5	7	27	20	81	28
глутамин	30	11	20	73	10	50	72
лейцин	10	11	13	81	20	63	62
лизин	10	5	3	81	0	38	66
метионин	20	11	10	77	20	75	66
серин	15	5	13	81	10	44	48
триптофан	35	21	17	81	20	81	52
цистеин солянокислый	10	16	10	46	10	75	38
цистеин	40	63	7	62	10	44	52
β-аланин	35	5	10	46	20	81	59
орнитин	20	21	3	73	20	69	55
β-фенил-β-аланин	10	0	3	50	0	88	52
норвалин	10	5	3	46	20	75	41
норлейцин	45	21	3	73	20	63	59

Примечание. Полужирным шрифтом выделены аминокислоты, потребность в которых у *Escherichia coli* превышала 15 %.

6 % нуждались в 1–4 аминокислотах, то в составе бактериопланктона озера Каменный карьер таких культур не оказалось, и все выделенные эшерихии были отнесены к полиауксотрофам (94 %). Полиауксотрофия установлена для 87 % исследуемых изолятов реки Лососинки. Для эшерихий, выделенных из Святозера, также характерна высокая потребность в факторах роста: ауксотрофность составила 83 %, нуждающимися в пяти и более аминокислотах оказались 79 % культур. Среди культур из реки Лососинки, озера Каменный карьер и Святозера встречались изоляты, нуждающиеся во всех анализируемых аминокислотах (21). Их количество составило 7, 6 и 14 % соответственно.

Питательные потребности эшерихий в отдельных факторах роста представлены в таблице 3. При культивировании *Escherichia coli* на

искусственных питательных средах с различным набором аминокислот обнаружены ауксотрофные варианты практически по всем аминокислотам. Так, в составе бактериопланктона Кондопожской губы не идентифицированы ауксотрофные варианты по отношению к β-фенил-β-аланину, из центральной части Онего – к валину, в Неглинке – по β-фенил-β-аланину и лизину. В целом можно отметить, что достоверно реже ($p < 0,05$) ауксотрофные варианты встречались в Онежском озере, чем в остальных водных объектах. Так, в центральной части только по глутамину и триптофану встречаемость ауксотрофов составила больше 15 %. В составе бактериопланктона Кондопожской губы изоляты эшерихий нуждались в цистеине (61 %), потребность в аланине, аргинине, глицине, аспарагине и цистеине составила 16 %,

в норлейцине, орнитине и триптофане – 21 %. Для Петрозаводской губы Онежского озера потребность в аминокислоте чаще, чем у 15 % культур, отмечена по 11 аминокислотам. 45 % ауксотрофных культур эшерихий, выделенных из Петрозаводской губы, были зависимы от наличия в среде норлейцина. Установлено, что норлейцин является аналогом метионина [Lawrence, 1979] и может замещать его в белках [Barker, Bruton, 1979; Bogosian et al., 1989]. Кроме того, синтез норлейцина клетками *E. coli* активируется при угнетении синтаз ацетогидроксикислот [Сычева, 2008].

Близкими к вариантам из Онежского озера по уровню ауксотрофности по отдельным аминокислотам оказались культуры, выделенные из р. Неглинки. Встречаемость зависимости от фактора роста отмечена по 13 аминокислотам. Наибольшая зависимость установлена для аргинина (40 %).

Культуры в составе бактериопланктона реки Лососинки, озера Каменный карьер и Святозера характеризовались очень высоким уровнем ауксотрофности по всем анализируемым аминокислотам, значительно превышая данный параметр в ранее анализируемых водных объектах. Так, средний уровень ауксотрофности эшерихий по отдельным аминокислотам составил в Святозере 49,5 %, в Лососинке – 56,6 % и в озере Каменный карьер – 70,7 %. Для Святозера и Лососинки отмечено сходство в том, что минимально культуры, выделенные в данных водных объектах, нуждались в гистидине и аспарагиновой кислоте. Наибольшая зависимость установлена для глутамина (72 %) среди ауксотрофных вариантов в Святозере. В составе бактериопланктона реки Лососинки больше всего (81 %) культур нуждались в лейцине, лизине, серине и триптофане. Изоляты из озера Каменный карьер менее всего оказались зависимы от наличия лизина: только для 38 % культур установлена зависимость роста от присутствия лизина в среде. Максимальная встречаемость (88 %) ауксотрофных вариантов среди выделенных эшерихий из данного водоема отмечена по аспарагиновой кислоте, фенилаланину и валину. С такой же частотой (88 %) встречались ауксотрофные варианты, которые давали рост в присутствии в среде β-фенил-β-аланина.

Рассматривая встречаемость ауксотрофов среди *E. coli* в различных «фундаментальных экологических нишах» Пермской области, Р. А. Пшеничнов и С. В. Колотников [1986] впервые предложили использовать потребность в факторах роста в качестве одного из параметров экологического мониторинга окружающей среды. Ими были обнаружены лишь отдельные

ауксотрофные варианты, выделенные из организма здоровых людей и сельскохозяйственных животных. В открытом проточном водоеме (р. Сылва), бытовых сточных водах г. Перми и промышленных стоках ауксотрофных вариантов не обнаружено [Пшеничнов, Колотников, 1986]. Данный факт объяснялся тем, что спонтанно возникающие формы ауксотрофов могли сохраняться только в полноценной среде (организм человека и животных), а в средах с качественно и количественно обедненным составом проходила элиминация дефектных культур [Пшеничнов, Колотников, 1986]. Однако при изучении питательных зависимостей 50 культур эшерихий, выделенных из открытого естественного водоема, находящегося в условиях минимального антропогенного воздействия, Ю. Н. Маслов и З. Л. Парамонова [1983] обнаружили одного ауксотрофа, нуждающегося в метионине. В рассматриваемых в рамках данного исследования акваториях ауксотрофные варианты выделялись в чистую культуру повсеместно. Кроме того, в водных объектах Рязанской области также выделены ауксотрофные варианты *E. coli* [Зацаринная, Круглова, 2012], а их встречаемость в целом оказалась выше (см. табл. 3), чем в водоемах Карелии.

Выводы

Впервые оценена встречаемость ауксотрофных вариантов среди штаммов *E. coli* в составе бактериопланктона Онежского озера, рек Неглинки и Лососинки, озер Каменный карьер и Святозеро. Изучена зависимость эшерихий от 21 аминокислоты, показана перспективность использования ауксотрофных вариантов в типизации водоемов по экологическому и эпидемическому статусу. Выдвинуто предположение, что встречаемость ауксотрофов может зависеть от типа антропогенного загрязнения, интенсивности влияния хозяйственно-бытовых сточных вод на экосистему и скорость естественного самоочищения. Таким образом, данные о распространении ауксотрофности среди эшерихий позволяют обосновать использование пищевых потребностей фоновых микроорганизмов в факторах роста для целей мониторинга и более подробно охарактеризовать сапрофитическую стадию их жизненного цикла. Выявление ауксотрофных вариантов *E. coli* в различных природных средах, установление зависимости частоты и особенностей появления ауксотрофов от места выделения, пищевых потребностей диких штаммов представляет большой интерес при изучении эволюции вида в разных географических регионах.

Литература

Биоресурсы Онежского озера. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2008. 272 с.

Бояринов П. М. Экологические проблемы Онежского озера в условиях возрастающей антропогенной нагрузки // Водные ресурсы Карелии и экология. Петрозаводск, 1992. С. 35–44.

Государственный доклад о состоянии окружающей среды в Республике Карелия в 2010 году / Мин-во по природопользованию и экологии РК. Петрозаводск: ИП Андреев П. Н., 2011. 292 с.

Государственный доклад о состоянии окружающей среды в Республике Карелия в 2011 году / Мин-во по природопользованию и экологии РК. Петрозаводск: ИП Андреев П. Н., 2012. 294 с.

Государственный доклад о состоянии окружающей среды в Республике Карелия в 2012 году / Мин-во по природопользованию и экологии РК. Петрозаводск: Два товарища, 2013. 328 с.

Государственный доклад о состоянии окружающей среды в Республике Карелия в 2013 году / Упр-е Росприроднадзора по РК. Петрозаводск, 2014. 300 с.

Жуков-Вережников Н. Н., Пехов А. П. Генетика бактерий. М.: Медгиз, 1963. 458 с.

Зацаринная Е. А., Круглова А. П. Некоторые особенности сапрофитической фазы *Escherichia coli* в водоемах Рязанской области // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой (24–28 сентября 2012 г.): тезисы докл. VI Всерос. конф. молодых ученых. Саратов, 2012. 31 с.

Ивантер Э. В., Коросов А. В. Введение в количественную биологию: учеб. пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, 2003. 302 с.

Ильмаст Н. В., Китаев С. П., Кучко Я. А., Павловский С. А. Гидроэкология разнотипных озер Южной Карелии. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2008. 92 с.

Куклева Л. М., Одинокоев Г. Н., Шавина Н. Ю. и др. Сравнительный анализ питательных потребностей штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновного подвидов и генетические причины их ауксотрофности // Проблемы особо опасных инфекций. 2013. Вып. 2. С. 33–36.

Маслов Ю. Н., Парамонова З. Л. Изучение гетерогенности природных популяций кишечной палочки. Сообщение I. Генетические маркеры природной популяции кишечной палочки, выделенной из открытых естественных водоемов // Гетерогенность популяций микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983. С. 9–13.

Онежское озеро: экологические проблемы / Отв. ред. Н. Н. Филатов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 1999. 293 с.

Пшеничников Р. А., Колотвинов С. В. Основы построения системы генетического мониторинга природных популяций микроорганизмов: пространственный мониторинг. Свердловск: Уральский научный центр РАН, 1986. 119 с.

Санитарная микробиология / Ред. Г. П. Калина, Г. Н. Читович. М.: Медицина, 1969. 384 с.

Сычева Е. В. Изучение элементов «скрытого» метаболизма 2-кетобутирата у *Escherichia coli* на

примере штаммов-продуцентов аминокислот: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2008. 31 с.

Теканова Е. В., Тимакова Т. М. Оценка современного трофического состояния Онежского озера по первичной продукции фитопланктона // Гидробиологический журнал. 2007. Т. 43, № 3. С. 90–93.

Barker D. G., Bruton C. J. The fate of norleucine as a replacement for methionine in protein synthesis // J. of Molecular Biology. 1979. Vol. 133, No 2. P. 217–231.

Bogosian G., Violand B. N., Dorward-King E. J. et al. Biosynthesis and incorporation into protein of norleucine by *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264. P. 531–539.

Clowes R. C., Hayes W. Experiments in microbial genetics. Oxford and Edinburgh: Blackwell scientific publications. 1968. 248 p.

D'Souza G., Waschina S., Pande S et al. Less is more: selective advantages can explain the prevalent loss of biosynthetic genes in bacteria // Evolution. 2014. Vol. 68–69. P. 2559–257. doi: 10.1111/evo.12468.

Giovannoni S. J., Tripp H. J., Givan S. et al. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium // Science, 2005. Vol. 309. P. 1242–1245. doi: 10.1126/science.1114057.

Ihssen J., Grasselli E., Bassin C. et al. Comparative genomic hybridization and physiological characterization of environmental isolates indicate that significant (eco-) physiological properties are highly conserved in the species *Escherichia coli* // Microbiology, 2007. Vol. 153, No 7. P. 2052–2066. doi: 10.1099/mic.02006/002006-0.

Koskiniemi S., Sun S., Berg O. G., Andersson D. I. Selection-driven gene loss in bacteria // PLoS Genetics. 2012. 8: e1002787. doi: 10.1371/journal.pgen.1002787.

Lawrence D. A. Regulation of methionine feedback-sensitive enzyme in mutants of *Salmonella typhimurium* // J. Bacteriol. 1972. Vol. 109, No 1. P. 8–11.

Lee M.-C., Marx C. J. Repeated, selection-driven genome reduction of accessory genes in experimental populations // PLoS Genetics. 2012. 8: e1002651. doi: 10.1371/journal.pgen.1002651.

McCutcheon J. P., Moran N. A. Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis // Proc Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 104, No 49. P. 19392–19397. doi: 10.1073/iti4907104.

Morris J. J., Lenski R. E., Zinser E. R. The black queen hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss // Mbio. Vol. 3, iss. 2. e00036-12. doi: 10.1128/mBio.00036-12.

Münster U. Concentration and fluxes of organic carbon substrates in the aquatic environment // Antonie Leeuwenhoek. 1993. Vol. 63, iss. 3–4. P. 243–274. doi: 10.1007/BF00871222.

Ochman H., Moran N. A. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis // Science. 2001. Vol. 292, No 5519. P. 1096–1099. doi: 10.1126/science.1058543.

van de Guchte M., Penaud S., Grimaldi C. et al. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* extensive and ongoing reductive evolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103, No 24. P. 9274–9279. doi: 10.1073/pnas.iti2406103.

Поступила в редакцию 26.06.2015

References

Bioresursyi Onezhskogo ozera [Bioresources of Onega Lake]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2008. 272 p.

Boyarinov P. M. Ekologicheskie problemy Onezhskogo ozera v usloviyah vozrastayushey antropogennoy nagruzki [Ecological problems of Onega Lake under increasing anthropogenic load]. *Vodnyie resursyi Karelii i ekologiya* [Water resources of Karelia and ecology]. Petrozavodsk, 1992. P. 35–44.

Gosudarstvennyj doklad o sostojanii okruzhajushhej sredy Respubliki Karelija v 2010 godu [State report on the condition of the environment of the Republic of Karelia in 2010]. Min-vo po prirodopol'zovaniyu i ekologii RK. Petrozavodsk: IP Andreev P. N., 2011. 292 p.

Gosudarstvennyj doklad o sostojanii okruzhajushhej sredy Respubliki Karelija v 2011 godu [State report on the condition of the environment of the Republic of Karelia in 2011]. Min-vo po prirodopol'zovaniyu i ekologii RK. Petrozavodsk: IP Andreev P. N., 2012. 294 p.

Gosudarstvennyj doklad o sostojanii okruzhajushhej sredy Respubliki Karelija v 2012 godu [State report on the condition of the environment of the Republic of Karelia in 2012]. Min-vo po prirodopol'zovaniyu i ekologii RK. Petrozavodsk: Dva tovarishha, 2013. 328 p.

Gosudarstvennyj doklad o sostojanii okruzhajushhej sredy Respubliki Karelija v 2013 godu [State report on the condition of the environment of the Republic of Karelia in 2013]. Min-vo po prirodopol'zovaniyu i ekologii RK. Petrozavodsk, 2014. 300 p.

Ivanter E. V., Korosov A. V. Vvedenie v kolichestvennyu biologiyu: ucheb. posobie [Introduction to quantitative biology. Manual]. Petrozavodsk: PetrSU Publ., 2003. 302 p.

Il'mast N. V., Kitaev S. P., Kuchko Ja. A., Pavlovskij S. A. Gidroekologiya raznotipnyh ozer Juzhnoj Karelii. [Hydroecology of polytypic lakes in southern Karelia]. Petrozavodsk: KarRS of RAS, 2008. 92 p.

Kukleva L. M., Odinokov G. N., Shavina N. Yu., Eroshenko G. A., Kutyrev V. V. Sravni-tel'nyj analiz pitatel'nykh potrebnostej shtammov Yersinia pestis osnovnogo i neosnovnogo podvidov i geneticheskie prichiny ikh auksotrofnosti [Comparative analysis of the nutrient requirements among Yersinia pestis strains of the main and non-main subspecies as well as genetic causes of their auxotrophy]. *Problemy osobo opasnykh infektsij* [Problems of particularly dangerous infections]. 2013. Iss. 2. P. 33–36.

Maslov Ju. N., Paramonova Z. L. Izuchenie geterogenosti prirodnyh populacij kishechnoj palochki. Soobshhenie I. Geneticheskie markery prirodnoj populacii kishechnoj palochki, vydelennoj iz otkrytyh esstvennykh vodoemov [The study of heterogeneity of natural populations of *E. coli*. Part I. Genetic markers of natural populations of *E. coli* isolated from open natural reservoirs]. *Geterogenost' populacij mikroorganizmov*. Sverdlovsk: UNC AN SSSR, 1983. P. 9–13.

Onezhskoe ozero: jekologicheskie problemy [Onega Lake: environmental problems]. Ed. N. N. Filatov. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 1999. 293 p.

Pshenichnov R. A., Kolotvinov S. V. Osnovy postroeniya sistemy geneticheskogo monitoringa prirodnykh populyatsij mikroorganizmov: prostranstvennyj monitoring

[The foundations of constructing a genetic monitoring system for natural microbial populations: spatial monitoring]. Sverdlovsk: Ural'skij nauchnyj tsentr RAN, 1986. 119 p.

Sanitarnaja mikrobiologija [Sanitary microbiology]. Eds. G. P. Kalina, G. N. Chitovich. Moscow: Medicina, 1969. 384 p.

Sycheva E. V. Izuchenie jelementov «skrytogo» metabolizma 2-ketobutirata u *Escherichia coli* na primere shtammov-producentov aminokislot [The study of «hidden» metabolism elements of 2-ketobutyrate in amino acid producing strains]: avtoref. ... dis. kand. biol. nauk [PhD Diss. (Biol.)]. Moscow. 2008. 31 p.

Tekanova E. V., Timakova T. M. Ocenka sovremen-nogo troficheskogo sostojanija Onezhskogo ozera po pervichnoj produkcii fitoplanktona [Assessment of current trophic state of Lake Onega by primary production of phytoplankton]. *Gidrobiologicheskij zhurnal* [Hydrobiological Journal]. 2007. Vol. 43, No 3. P. 90–93.

Zhukov-Verezhnikov N. N., Pekhov A. P. Genetika bakterij [Bacterial genetics]. Moscow: Medgiz, 1963. 458 p.

Zatsarinnaya E. A., Kruglova A. P. Nekotorye osobennosti saprofiticheskoy fazy *Escherichia coli* v vodoemakh Ryazanskoj oblasti [Some features of the saprophytic phase of *Escherichia coli* in the water bodies of the Ryazan region]. Strategiya vzaimodejstviya mikroorganizmov i rastenij s okruzhajushhej sredoj (24–28 sentyabrya 2012 g.): tezisy dokl. VI Vseros. konf. molodykh uchenykh [Interaction strategy of microorganisms and plants with the environment (September 24–28, 2012). Abstr. rept. 6th All-Russian conf. of young scientists]. Saratov, 2012. 31 p.

Barker D. G., Bruton C. J. The fate of norleucine as a replacement for methionine in protein synthesis. *J. of Molecular biology*. 1979. Vol. 133, No. 2. P. 217–231.

Bogolian G., Violand B. N., Dorward-King E. J., Workman W. E., Jung P. E., Kane J. F. Biosynthesis and incorporation into protein of norleucine by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. 1989. Vol. 264. P. 531–539.

Clowes R. C., Hayes W. Experiments in microbial genetics. Oxford and Edinburgh: Blackwell scientific publications. 1968. 248 p.

D'Souza G., Waschina S., Pande S., Bohl K., Kalita Ch., Kost Ch. Less is more: selective advantages can explain the prevalent loss of biosynthetic genes in bacteria. *Evolution*. 2014. Vol. 68–69. P. 2559–257. doi: 10.1111/evo.12468.

Giovannoni S. J., Tripp H. J., Givan S., Podar M., Vergin K. L., Baptista D., Bibbs L., Eads J., Richardson T. H., Noordewier M. et al. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science*. 2005. Vol. 309. P. 1242–1245. doi: 10.1126/science.1114057.

Ihssen J., Grasselli E., Bassin C., François P., Piffaretti J.-C., Köster W., Schrenzel J., Egli T. Comparative genomic hybridization and physiological characterization of environmental isolates indicate that significant (eco-) physiological properties are highly conserved in the species *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2007. Vol. 153, No 7. P. 2052–2066. doi: 10.1099/mic.02006/002006-0.

Koskiniemi S., Sun S., Berg O. G., Andersson D. I. Selection-driven gene loss in bacteria. *PLoS Genetics*. 2012. 8: e1002787. doi: 10.1371/journal.pgen.1002787.

Lawrence D. A. Regulation of methionine feedback-sensitive enzyme in mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 1972. Vol. 109, No 1. P. 8–11.

Lee M.-C., Marx C. J. Repeated, selection-driven genome reduction of accessory genes in experimental populations. *PLoS Genetics*. 2012. 8: e1002651. doi: 10.1371/journal.pgen.1002651.

McCutcheon J. P., Moran N. A. Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 104, No 49. P. 19392–19397. doi: 10.1073/iti4907104.

Morris J. J., Lenski R. E., Zinser E. R. The black queen hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss. *Mbio*. Vol. 3, iss. 2. e00036–12. doi: 10.1128/mBio.00036-12.

Münster U. Concentration and fluxes of organic carbon substrates in the aquatic environment. *Antonie Leeuwenhoek*. 1993. Vol. 63, iss. 3–4. P. 243–274. doi: 10.1007/BF00871222.

Ochman H., Moran N. A. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science*. 2001. Vol. 292, No 5519. P. 1096–1099. doi: 10.1126/science.1058543.

van de Guchte M., Penaud S., Grimaldi C., Barbe V., Bryson K., Nicolas P., Robert C., Oztas S., Mangenot S., Couloux A. et al. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* extensive and ongoing reductive evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. Vol. 103, No 24. P. 9274–9279. doi:10.1073/pnas.iti2406103.

Received June 26, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сидорова Наталья Анатольевна

доцент курса микробиологии медицинского института, к. б. н.
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: vanlis@petsu.ru
тел.: (8142) 795318

Зацаринная Екатерина Андреевна

младший научный сотрудник науч. лаб. эволюционной экологии
Рязанский государственный университет им. С. А. Есенина
ул. Свободы, 46, Рязань, Россия, 390000
эл. почта: i.zatsarinniy@rsu.edu.ru
тел.: (4912) 281936

CONTRIBUTORS:

Sidorova, Natalia

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: vanlis@petsu.ru
tel.: (8142) 795318

Zatsarinnaya, Ekaterina

Ryazan State University named for S. A. Yesenin
46 Svoboda St., 390000 Ryazan, Russia
e-mail: i.zatsarinniy@rsu.edu.ru
tel.: (4912) 281936

УДК 636.93

СТИМУЛЯЦИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ САМОК И САМЦОВ ПУШНЫХ ЗВЕРЕЙ

О. Ю. Беспятых^{1,2}, Н. В. Пронина¹, О. Н. Сухих¹, А. Е. Кокорина¹

¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт охотничьего хозяйства и звероводства им. проф. Б. М. Житкова*

² *Вятский государственный гуманитарный университет*

В условиях Кировской области изучали влияние гуминового препарата лигногумат на репродуктивную функцию пушных зверей при введении в рацион. У самок норки лигногумат увеличивает количество зарегистрированных щенков к отсадке на 0,8 головы при включении в рацион в течение месяца до гона, число благополучно оцененных самок и их плодовитость, количество зарегистрированных щенков к отсадке на 0,7–1,5 головы при включении в рацион в течение месяца до гона и во вторую половину беременности. У самок лисиц препарат снижает количество пропустовавших и неблагополучно родивших самок в 3–4 раза, увеличивает количество благополучно оцененных самок на 16–17 %, сохранность щенков на 19 % и количество зарегистрированных щенков на 0,8–1,5 головы. У самок песца лигногумат оказывает негативное влияние на репродуктивную функцию молодых самок (в возрасте до года) и положительное воздействие на репродуктивную функцию старых самок (в возрасте 2–4 лет). У последних он увеличивал количество благополучно оцененных самок на 8 % и их плодовитость на 31 %. У самцов норки и лисицы препарат увеличивал количество зарегистрированных щенков, полученных в расчете на благополучно оцененную и на племенную самку на 0,5–1,5 головы. Таким образом, лигногумат стимулирует репродуктивную функцию самок пушных зверей при введении в рацион в течение месяца до гона и во вторую половину беременности в дозе 0,3 мл/кг массы тела, а также репродуктивную функцию самцов при введении в рацион в течение месяца до гона в той же дозе. Исключение составляют молодые самки песца.

К л ю ч е в ы е с л о в а: пушные звери; норка; лисица; песец; стимуляция; репродуктивная функция; лигногумат.

O. Yu. Bespyatykh, N. V. Pronina, O. N. Sukhikh, A. E. Kokorina.
STIMULATION OF REPRODUCTIVE FUNCTION IN FEMALE AND MALE FUR ANIMALS

The effect of humic product Lignohumate addition to the diet on the reproduction of fur animals was studied in the Kirov region. Lignohumate increases the number of registered pups at separation time by 0.8 pups when included in the diet of female mink during the month before estrus, and it increases the number of successfully whelped females, their fertility and the number of registered pups at separation time by 0.7–1.5 pups when included in the diet of female mink during the month before estrus and during the second half of gestation. The product reduces the number of unproductive female foxes and defective litter by 3–4 times, increases the number of successfully whelped female

foxes by 16–17 %, the survival rate of pups by 19 % and the number of registered pups by 0.8–1.5 pups. Lignohumate has a negative impact on the reproductive function of young female arctic foxes (aged up to one year) and a positive effect on the reproductive function of older female arctic foxes (aged 2–4 years). It increased the number of successfully whelped older female foxes by 8 % and their fertility by 31 %. The product increases the reproductive function in male mink and fox resulting in the growth of the number of registered pups by 0.5–1.5 pups per female. Thus, Lignohumate stimulates the reproductive function of female fur animals when added to the diet during the month before estrus and during the second half of gestation in a dose of 0.3 ml/kg of body weight, and the reproductive function of males when introduced to the diet during the month before estrus in the same dose. The exception is young female arctic fox.

Key words: fur animals; mink; fox; arctic fox; stimulation; reproductive function; lignohumate.

Введение

Повышение репродуктивной функции животных является одной из важнейших задач звероводства, не потерявшей свою актуальность до настоящего времени.

Основными причинами снижения репродуктивной способности являются негативное воздействие на организм стресс-факторов, эмбриональная смертность, физическая и физиологическая неподготовленность зверей к спариванию, неправильное кормление, содержание и другие. Следует отметить, что в промышленном звероводстве большее внимание уделяется селекции животных по показателям продуктивности и меньшее – отбору зверей по устойчивости к производственным стресс-факторам. Из пушных зверей наиболее чувствительной к стрессам является красная лисица, наименее – песец.

В звероводстве активно применяются биологически активные вещества различной природы. В последнее время разработаны новые отечественные препараты гуминового ряда, соответствующие мировому уровню, в частности лигногумат.

Лигногумат – это кормовая добавка на основе калиевых солей гуминовых кислот, полученных методом окислительно-гидролитической деструкции лигносодержащего сырья от переработки древесины хвойных и лиственных пород. Выпускается в виде порошка и 20%-го раствора. Препарат содержит не менее 58 % органических веществ (от сухого вещества), 60 % высокомолекулярных гуминовых кислот (от органических веществ), не более 40 % фульвовых и низкомолекулярных кислот (от органических веществ).

Препарат положительно зарекомендовал себя в птицеводстве и свиноводстве [Бессарабов и др., 2006, 2007; Сечин и др., 2014; Топурия и др., 2014]. Лигногумат стимулирует рост

животных, повышает общую резистентность организма, улучшает обмен веществ, обладает высокими антиоксидантными и антистрессовыми свойствами. Гуминовые препараты безвредны для животных и человека. Они не вызывают аллергии, не имеют канцерогенных, тератогенных и эмбриотоксических свойств.

В звероводстве лигногумат не использовали до настоящего времени, поэтому изучение его влияния на репродуктивную функцию пушных зверей представляет несомненный интерес для специалистов-практиков.

Материалы и методы

Исследования проводили в 2013–2014 гг. на племенном поголовье пушных зверей ООО «Зверохозяйство «Вятка» и ООО «Русский велюр» (Кировская обл.). Из самок норки браун (*Neovison vison*, Schr.), с сомнительной реакцией к вирусу алеутской болезни, по принципу групп-аналогов сформировали три группы: 1 – контрольная – звери получали общехозяйственный рацион, 2 – дополнительно в рацион вводился лигногумат КД-Б в дозе 0,3 мл/кг массы тела в течение месяца до гона, 3 – дополнительно в рацион включался лигногумат КД-Б в дозе 0,3 мл/кг массы тела в течение месяца до гона и во вторую половину беременности.

Лигногумат КД-Б представляет собой 20%-й раствор, который перед применением взбалтывают, затем вводят в кормосмесь и перемешивают.

Из племенных самок серебристо-черной лисы (*Vulpes vulpes* L.) и из самок песца шэдоу (*Alopex lagopus* L.) было сформировано по две группы: контрольная – звери получали общехозяйственный рацион и опытная – дополнительно в рацион вводился лигногумат КД-Б в дозе 0,3 мл/кг массы тела в течение месяца до гона и во вторую половину беременности. Кроме того, в каждой группе при анализе данных

выделяли молодых самок – в возрасте до 1 года и старых – в возрасте 2–4 лет.

Из племенных самцов норки браун и платиновой лисицы также формировали две группы: контрольная – звери получали общехозяйственный рацион и опытная – дополнительно в рацион вводился лигногумат КД-Б в дозе 0,3 мл/кг массы тела в течение месяца до гона.

В ходе исследований у пушных зверей оценивали общее физиологическое состояние и показатели, характеризующие репродуктивную функцию. Результаты исследований обработаны статистически с использованием программы «Biostat», при этом достоверность различий между группами считали с $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Включение лигногумата в рацион самок норки в течение месяца только до гона способствует повышению плодовитости самок, что в результате увеличивает выход щенков к отсадке на племенную самку на 0,8 гол. в сравнении с контрольной группой (табл. 1). Введение препарата в рацион зверей в течение месяца до гона и во вторую половину беременности кроме

повышения плодовитости самок ($p < 0,05$) еще и уменьшает количество пропустовавших, а также увеличивает число благополучно оцененных самок. Поэтому в данной группе выход щенков на благополучно оцененную самку и на племенную самку больше на 0,76 и 1,6 гол. ($p < 0,05$) соответственно, чем в контрольной группе.

Увеличение числа благополучно оцененных самок после дополнительного введения препарата во вторую половину беременности связано с его оптимизирующим влиянием на организм зверей, которое способствует снижению эмбриональной смертности, так как известно, что около 30 % эмбрионов норки гибнет в латентную фазу, когда эмбрионы свободно перемещаются, мигрируют из рога в рог матки, а 70 % эмбрионов гибнет после имплантации [Абрамов и др., 1970; Абрамов, 1976; Колповский, 1982; Murphy, Mead, 1983].

Введение препарата в рацион самок лисицы способствовало снижению числа пропустовавших и неблагополучно родивших самок в среднем в 3–4 раза, увеличению количества благополучно оцененных самок в среднем на 16–17 % и сохранности щенков в среднем на

Таблица 1. Репродуктивная функция племенных самок норки

Показатели воспроизводства	Контрольная группа	Опытная группа, получавшая препарат:	
		до гона	до гона и во время беременности
Кол-во самок, гол.	145	123	34
Покрыто самок, %	100	100	100
Пало самок, %	7,59	8,13	8,82
Пропустовало самок, %	70,34	58,54	23,53
Благополучно оценено самок, %	22,07	33,33	67,65
Плодовитость самок, гол.	3,53 ± 0,5 #	4,47 ± 0,6	5,04 ± 0,4
Сохранность щенков, %	64,53	63,60	61,98
Зарегистрировано щенков:			
– на благополучно оцененную самку, гол.	2,12 ± 0,4	2,84 ± 0,4	2,88 ± 0,5
– на племен. самку, гол.	0,63 ± 0,3 #	1,18 ± 0,3 #	2,21 ± 0,4

Примечание. # – различия с 3-й группой достоверны ($p < 0,05$).

Таблица 2. Репродуктивная функция племенных самок лисицы

Показатели воспроизводства	Контрольная группа		Опытная группа	
	молодые самки	старые самки	молодые самки	старые самки
Кол-во самок, гол.	12	13	10	14
Покрыто самок, %	100	100	100	100
Пропустовало самок, %	16,7	7,7	0	7,1
Неблагополучно родившие самки, %	8,3	7,7	0	0
Благополучно оценено самок, %	75,0	84,6	100	92,9
Плодовитость самок, гол.	7,3 ± 0,5	7,2 ± 0,3	6,2 ± 0,6	6,8 ± 0,4
в т. ч. мертворожд. щенков, гол.	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0
Сохранность щенков, %	66,2	77,6	91,7	90,9
Зарегистрировано щенков:				
– на благополучно оцененную самку, гол.	4,8 ± 0,6	5,4 ± 0,6	5,5 ± 0,4	6,2 ± 0,3
– на племенную самку, гол.	3,6 ± 0,6	4,5 ± 0,5	5,5 ± 0,4 #	5,8 ± 0,3 #

Примечание. # – различия с контрольной группой достоверны ($p < 0,05$).

Таблица 3. Репродуктивная функция племенных самок песца

Показатели воспроизводства	Контрольная группа		Опытная группа	
	молодые самки	старые самки	молодые самки	старые самки
Кол-во самок, гол.	10	20	8	18
Покрыто самок, %	100	100	100	100
Пропустовало самок, %	10,0	25,0	12,5	11,1
Неблагополучно родившие самки, %	0	0	12,5	5,6
Благополучно оценилось самок, %	90,0	75,0	75,0	83,3
Плодовитость самок, гол.	10,3 ± 0,7	11 ± 0,5 #	11,8 ± 0,8 #	14,4 ± 0,5
в т. ч. мертворожд. щенков, гол.	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,2	2,2 ± 0,4	1,7 ± 0,3
Сохранность щенков, %	72,4	89,1	65,5	78,9
Зарегистрировано щенков:				
– на благополучно оценившуюся самку, гол.	7,0 ± 0,5	9,2 ± 0,5 *	6,3 ± 0,6 #	10,0 ± 0,4
– на племенную самку, гол.	6,3 ± 0,6	7,4 ± 0,3 #	4,8 ± 0,7 #	8,3 ± 0,3

Примечание. # – различия с 4-й группой достоверны ($p < 0,05$), * различия с 1-й группой достоверны ($p < 0,05$).

Таблица 4. Репродуктивная функция племенных самцов норки и лисицы

Показатели воспроизводства	Норка		Лисица	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Покрыто самок, гол.	4,23 ± 0,5	4,33 ± 0,5	3,0 ± 0,5	3,3 ± 0,5
Благополучно оценилось самок, гол.	1,55 ± 0,5	1,5 ± 0,4	2,4 ± 0,5	3,0 ± 0,3
Рождено щенков на благополучно оценившуюся самку, гол.	4,69 ± 0,5	5,46 ± 0,3	6,75 ± 0,6	7,6 ± 0,4
Рождено щенков на племенную самку, гол.	1,98 ± 0,5	2,52 ± 0,5	5,4 ± 0,5 #	6,9 ± 0,4

Примечание. Данные приведены в расчете на 1-го самца по результатам щенения самок, покрытых им. # – различия с 4-й группой достоверны ($p < 0,05$).

19 %, что в итоге привело к повышению числа зарегистрированных щенков в расчете на благополучно оценившуюся и племенную самку в среднем на 0,8–1,5 щенка ($p < 0,05$) соответственно, в сравнении с контрольной группой (табл. 2). При этом лигногумат оказывал стимулирующее влияние на репродуктивную функцию как молодых (в возрасте до года), так и старых самок (в возрасте 2–4 лет).

Возраст оказался важен при введении лигногумата в рацион самок песца. Препарат негативно влиял на репродуктивную функцию молодых самок (в возрасте до года) и положительно воздействовал на воспроизводительную способность старых самок (в возрасте 2–4 лет). У последних он способствовал увеличению количества благополучно оценившихся самок на 8 % и плодовитости – на 31 % ($p < 0,05$) (табл. 3), что, несмотря на уменьшение сохранности щенков, в итоге привело к повышению числа зарегистрированных щенков в расчете на благополучно оценившуюся и племенную самку на 0,8–0,9 щенка ($p < 0,05$), в сравнении с контрольной группой.

Отсутствие стимулирующего влияния лигногумата на молодых самок песца, вероятно, обусловлено более высокой гомеостатированностью организма песца, то есть меньшей пластичностью к изменяющимся условиям существования в сравнении с другими пушными зверями, что обеспечивает его адаптацию к суровым

условиям Заполярья [Sillero-Zubiri et al., 2004]. Подобная реакция организма молодняка песца на введение препаратов (селенит натрия, янтарная кислота и др.), эффективность которых доказана на других животных, отмечена и другими исследователями [Сергина и др., 2009; Беспятых и др., 2011; Кокорина, Беспятых, 2011].

Для объективности необходимо отметить, что негативное действие препарата на молодых самок песца частично могло быть обусловлено климатическим фактором, так как во время их щенения (позже старых самок) наступило похолодание.

Включение лигногумата в рацион племенных самцов норки и лисицы способствовало увеличению количества щенков, полученных в расчете на благополучно оценившуюся и на племенную самку на 0,5–1,5 гол. соответственно ($p < 0,05$), в сравнении с контрольной группой (табл. 4).

Более эффективное действие лигногумата при введении в рацион зверей в течение месяца до гона и во вторую половину беременности по сравнению с его введением только в течение месяца до гона согласуется с данными, полученными нами ранее при изучении влияния янтарной кислоты на воспроизводительную способность племенных самок пушных зверей [Беспятых, 2010, 2011]. Вероятно, это связано со снижением эмбриональной смертности в результате оптимизации обмена веществ и повышения стрессоустойчивости животных.

Выводы

1. Лигногумат эффективно стимулирует репродуктивную функцию самок при введении в рацион в течение месяца до гона и во вторую половину беременности.
2. Препарат оказывает стимулирующее влияние на самок независимо от их возраста, за исключением молодых самок песца.
3. Лигногумат при введении в рацион самцов в течение месяца до гона способствует повышению их репродуктивной функции.
4. Препарат целесообразно вводить в дозе 0,3 мл/кг массы тела в рацион племенных самок в течение месяца до гона и во вторую половину беременности, в рацион племенных самцов – в течение месяца до гона.

Литература

Абрамов М. Д., Бернацкий В. Г., Носова Н. Г. О причинах пропустования и малоплодия норок // Науч. тр. НИИПЗК. М., 1970. Т. 9. С. 129–132.

Абрамов М. Д. Причины бесплодия и меры повышения репродуктивных свойств норок // Интенсификация производства клеточной пушнины. М.: Россельхозиздат, 1976. С. 57–67.

Беспярых О. Ю. Использование янтарной кислоты с целью улучшить хозяйственно полезные признаки у лисиц // Кролиководство и звероводство. 2010. № 1. С. 8–9.

Беспярых О. Ю., Кокорина А. Е., Тебенькова Т. В. Рост и качество шкурок молодняка пушных зверей при использовании добавки янтарной кислоты // Проблемы биологии продуктивных животных. 2011. № 3. С. 91–97.

References

Abramov M. D., Bernatskii V. G., Nosova N. G. O prichinakh propustovaniya i maloplodiya norok [Some causes of mink barrenness and low fertility]. *Nauch. tr. NIIPZK [Proc. Res. Inst. of fur farming and rabbit breeding]*. Moscow, 1970. Vol. 9. P. 129–132.

Abramov M. D. Prichiny besplodiya i mery povyshe-niya reproduktivnykh svoistv norok [Causes of infertility and ways to enhance reproductive characteristics of mink]. *Intensifikatsiya proizvodstva kletochnoi pushniny [Intensification of fur-bearing animals husbandry]*. Moscow: Rossel'khizdat, 1976. P. 57–67.

Bespyatykh O. Yu. Ispol'zovanie yantarnoi kisloty s tsel'yu uluchshit' khozyaistvenno poleznye priznaki u lisits [The effect of succinic acid on the improvement of economically valuable characteristics in foxes]. *Krolikovodstvo i zverovodstvo [Rabbit breeding and farming]*. 2010. No 1. P. 8–9.

Bespyatykh O. Yu., Kokorina A. E., Teben'kova T. V. Rost i kachestvo shkurok molodnyaka pushnykh zveri pri ispol'zovanii dobavki yantarnoi kisloty [Effect of

Беспярых О. Ю. Повышение воспроизводительной способности пушных зверей // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2011. № 2. С. 49–50.

Бессарабов Б. Ф., Мельникова И. И., Дугин А. В. и др. Применение Лигногумата КД в птицеводстве: Методические рекомендации. М. 2007. 15 с.

Бессарабов Б., Мельникова И., Фомин А. Эффективность Лигногумата КД-А при выращивании цыплят-бройлеров // Птицеводство. 2006. № 6. С. 15–16.

Кокорина А. Е., Беспярых О. Ю. Эффективность применения янтарной кислоты на племенных самках лисиц и песцов // Зоотехния. 2011. № 8. 36 с.

Колповский В. М. Эмбриональная смертность у американской норки, ВНИИОЗ // Обогащение фауны и разведение охотничьих животных. Киров, 1982. 179 с.

Сергина С. Н., Ильина Т. Н., Илюха В. А. и др. Особенности функционирования антиоксидантной системы хищных млекопитающих под влиянием селенита натрия // Сельскохозяйственная биология. 2009. № 6. С. 66–72.

Сечин В. А., Топурия Г. М., Семенов С. В. Влияние Лигногумата КД-А на продуктивность свиноматок // Достижения науки и техники АПК. 2014. № 5. С. 45–46.

Топурия Г. М., Топурия Л. Ю., Семенов С. В. Физиологический статус организма свиней при использовании в рационе Лигногумата КД-А // Ветеринария Кубани. 2014. No 3.

Murphy B. D., Mead R. A. Luteal contribution to the termination of preimplantation delay in mink // *Biol. Reprod.* 1983. Vol. 28, No 2. P. 497–503.

Sillero-Zubiri C., Hoffmann M., McDonald D. W. Canids: foxes, wolves, jackals and dog. N. Y., USA, 2004. 430 p.

Поступила в редакцию 26.06.2015

succinic acid additive on the growth of young fur animals and the quality traits of pelts]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh [Problems of productive animal biology]*. 2011. No 3. P. 91–97.

Bespyatykh O. Yu. Povyshenie vosproizvoditel'noi sposobnosti pushnykh zveri [Improving the reproductive characteristics of fur-bearing animals]. *Doklady Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk [Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences]*. 2011. No 2. P. 49–50.

Bessarabov B. F., Mel'nikova I. I., Dugin A. V., Sadchikov S. Yu., Fomin A. V. Primenenie Lignogumata KD v ptitsevodstve: Metodicheskie rekomendatsii [Application of Lignohumate KD in poultry farming. Methodical recommendation]. Moscow, 2007. 15 p.

Bessarabov B., Mel'nikova I., Fomin A. Effektivnost' Lignogumata KD-A pri vyrashchivanii tsyplyat-broilerov [Efficiency of Lignohumate-CD-A application in broiler chicken farming]. *Ptitsevodstvo [Poultry farming]*. 2006. No 6. P. 15–16.

Kokorina A. E., Bespyatykh O. Yu. Effektivnost' primeneniya yantarnoi kisloty na plemennykh samkakh li-sits i pestsov [Effect of succinic acid on breeding female foxes and polar foxes]. *Zootekhnika* [Zootechny]. 2011. No 8. 36 p.

Kolpovskii V. M. Embrional'naya smertnost' u ameri-kanskoi norki, VNIIOZ [Embryonic death in American mink. All-Union Res. Inst. of hunting and fur farming]. *Obogashchenie fauny i razvedenie okhotnich'ikh zhi-votnykh* [Enrichment of the fauna and breeding of game animals]. Kirov, 1982. 179 p.

Sergina S. N., Il'ina T. N., Ilyukha V. A., Fatyshe-va M. V., Podlepina L. G. Osobennosti funktsioniro-vaniya antioksidantnoi sistemy khishchnykh mleko-pitayushchikh pod vliyaniem selenita natriya [Fea-tures of antioxidant system functioning in carnivorous mammals under the influence of sodium selenite]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural biolo-gy]. 2009. No 6. P. 66–72.

Sechin V. A., Topuriya G. M., Semenov S. V. Vliyanie Lignogumata KD-A na produktivnost' svinomatok [Ef-fect of Lignohumate-CD-A on breeding sows productivi-ty]. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK* [Achievements of science and technology in agricultural complex]. 2014. No 5. P. 45–46.

Topuriya G. M., Topuriya L. Yu., Semenov S. V. Fizio-logicheskii status organizma svinei pri ispol'zovanii v ra-tsiione Lignogumata KD-A [Physiological status of pigs at the use of Lignohumate-CD-A in the ration]. *Veteri-nariya Kubani* [Veterinary of Kuban]. 2014. No 3.

Murphy B. D., Mead R. A. Luteal contribution to the termination of preimplantation delay in mink. *Biol. Re-prod.* 1983. Vol. 28, No 2. P. 497–503.

Sillero-Zubiri C., Hoffmann M., McDonald D. W. Ca-nids: foxes, wolves, jackals and dog. N. Y., USA, 2004. 430 p.

Received June 26, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Беспятых Олег Юрьевич

ведущий научный сотрудник, к. б. н.
Всероссийский научно-исследовательский институт
охотничьего хозяйства и звероводства
им. проф. Б. М. Житкова
ул. Преображенская, 79, Киров, Россия, 610000
доцент
Вятский государственный гуманитарный университет
ул. Красноармейская, 26, Киров, Россия, 610002
эл. почта: b_oleg@mail.ru
тел.: 89226626820

Пронина Наталья Владимировна

аспирант
Всероссийский научно-исследовательский институт
охотничьего хозяйства и звероводства
им. проф. Б. М. Житкова
ул. Преображенская, 79, Киров, Россия, 610000
эл. почта: bio.vniioz@mail.ru

Сухих Олеся Николаевна

аспирант
Всероссийский научно-исследовательский институт
охотничьего хозяйства и звероводства
им. проф. Б. М. Житкова
ул. Преображенская, 79, Киров, Россия, 610000
эл. почта: bio.vniioz@mail.ru

Кокорина Анастасия Евгеньевна

научный сотрудник
Всероссийский научно-исследовательский институт
охотничьего хозяйства и звероводства
им. проф. Б. М. Житкова
ул. Преображенская, 79, Киров, Россия, 610000
эл. почта: bio.vniioz@mail.ru

CONTRIBUTORS:

Bespyatykh, Oleg

Russian Research Institute of Game Management
and Fur Farming
79 Preobrajenskaia St., Kirov, Russia
Vyatka State University of Humanities
26 Krasnoarmeyskaia St., Kirov, Russia
e-mail: b_oleg@mail.ru
tel.: 89226626820

Pronina, Natalia

Russian Research Institute of Game Management
and Fur Farming
79 Preobrajenskaia St., Kirov, Russia
e-mail: bio.vniioz@mail.ru

Sukhikh, Olesia

Russian Research Institute of Game Management
and Fur Farming
79 Preobrajenskaia St., Kirov, Russia
e-mail: bio.vniioz@mail.ru

Kokorina, Anastasia

Russian Research Institute of Game Management
and Fur Farming
79 Preobrajenskaia St., Kirov, Russia
e-mail: bio.vniioz@mail.ru

УДК 57.084.1:57.087.1:519.254:51-76

О РЕГИСТРАЦИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

Е. Г. Ионкина¹, А. В. Колчин

¹ *Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России*

Разработана, собрана и отлажена портативная установка для регистрации электрической активности головного мозга. Установка успешно использована для регистрации электроэнцефалограммы и ноцицептивных вызванных потенциалов в соматосенсорной S₁HL и передней поясной Cg областях правого полушария коры головного мозга крысы. Важными характеристиками данной электрофизиологической установки являются высокая чувствительность, отсутствие фильтров, а также высокое разрешение измерений, что ведет к практическому отсутствию потерь данных при регистрации электрической активности головного мозга в режиме реального времени. Предотвращение искажения регистрируемого сигнала от внешних электромагнитных шумов было обеспечено многослойным экранированием исследуемого объекта и обеспечением автономного питания установки постоянным током. Данная электрофизиологическая установка портативна и может работать под управлением переносного компьютера. Совокупность решений, примененных при сборке, настройке и практическом использовании установки, обладает новизной и позволяет решать широкий круг задач в области электрофизиологии.

Ключевые слова: крыса; электроэнцефалограмма; вызванные потенциалы; кора головного мозга.

H. G. Ionkina, A. V. Kolchin. ACQUISITION OF THE ELECTRICAL ACTIVITY OF RAT CEREBRAL CORTEX

We constructed a portable system for acquisition of brain electrical activity. We succeeded in acquiring the electroencephalogram and nociceptive evoked potentials in the somatosensory S₁HL and the anterior cingulate Cg cortexes in the right hemisphere in rats. The key features of the system are high sensitivity; absence of any filters; high-resolution measurement. All this results in the near-zero loss of data while acquiring the real time brain electrical activity. The problem of preventing the influence of intense electromagnetic pollution was solved by multilayer shielding of the analogue part of the system and using a stand-alone direct current source to feed the entire system. This system is portable and can be operated using a laptop computer. The solutions we have utilised while setting up this system are pioneering, and allow us to deal with a wide range of problems related to electrophysiology.

Key words: rat; electroencephalogram; evoked potentials; cerebral cortex.

Разработана портативная установка для регистрации электрической активности головного мозга, которая в дальнейшем была успешно использована для регистрации ноцицептивных вызванных потенциалов (ВП) в коре головного мозга крысы.

Данная электрофизиологическая установка базируется на портативном компьютере с процессором Intel Pentium IV (в нашем случае IBM ThinkPad G40) под управлением Linux, ядро 2.6.xx. Поэтому аналого-цифровой преобразователь выбирался из числа поддерживаемых проектом COMEDI [Schleef et al., 2014], имеющим целью разработку инструментов и библиотек с открытым кодом для сбора данных, реализованных в виде модулей ядра операционной системы, поддерживающих режим реального времени. Нами был выбран 16-канальный АЦП *usbdux-fast*, который, как и 4-канальный усилитель, собран по открытым спецификациям [см. Porr, 2007, 2012], предоставленным Incite Technology Ltd., Computing & Maths Dept. в University of Stirling, Великобритания; усилитель первоначально был разработан для обучения технике ЭКГ на медицинском факультете в Ruhr-Universität Bochum. Использовались общедоступные электронные компоненты на заказных печатных платах. Принципиальные схемы аналого-цифрового преобразователя и усилителя представлены соответственно на рис. 1 и 2. Благодаря наличию открытых исходных текстов как библиотек, так и микропрограммного обеспечения аналого-цифрового преобразователя во время экспериментов были успешно за минимальный срок внесены необходимые изменения и доработки.

Важной характеристикой установки является то, что в составе ни аналого-цифрового преобразователя, ни усилителя не присутствуют

какие-либо фильтры входного сигнала, ведущие к неизбежной потере исходных данных. Однако при необходимости разработанная система способна осуществлять программную фильтрацию входного сигнала в режиме реального времени.

Если лабораторное животное принять в качестве «черного ящика», на вход которого может быть подан некий внешний стимул и на выходе которого имеем постоянный поток данных высокой интенсивности, то задачей эксперимента является выделение отклика на входной стимул в потоке выходных данных. В настоящем исследовании изучалось участие коры больших полушарий в формировании ноцицептивных реакций с помощью регистрации ВП в соматосенсорной S_1 HL и передней поясной Cg областях коры головного мозга в правом полушарии в ответ на электрокожное раздражение хвоста у иммобилизованных на платформе самцов крыс серии Wistar до, а также на 1, 3 и 7-е сутки после внутрибрюшинного введения липополисахарида (LPS). Раздражение хвоста крыс осуществлялось одиночными импульсами тока прямоугольной формы, составляющими 80 % величины порога вокализации исходного фона. Усреднение ВП осуществлялось из 30 реализаций. Начало записи электрической активности мозга крысы управлялось синхроимпульсом, соответствующим переднему фронту стимулирующего импульса. Генерацию стимулирующих импульсов возможно осуществлять под управлением переносного компьютера.

Регистрация электрической активности головного мозга крысы осуществлялась в условиях интенсивного электромагнитного загрязнения окружающей среды, характерного для современных мегаполисов. Эта сложная

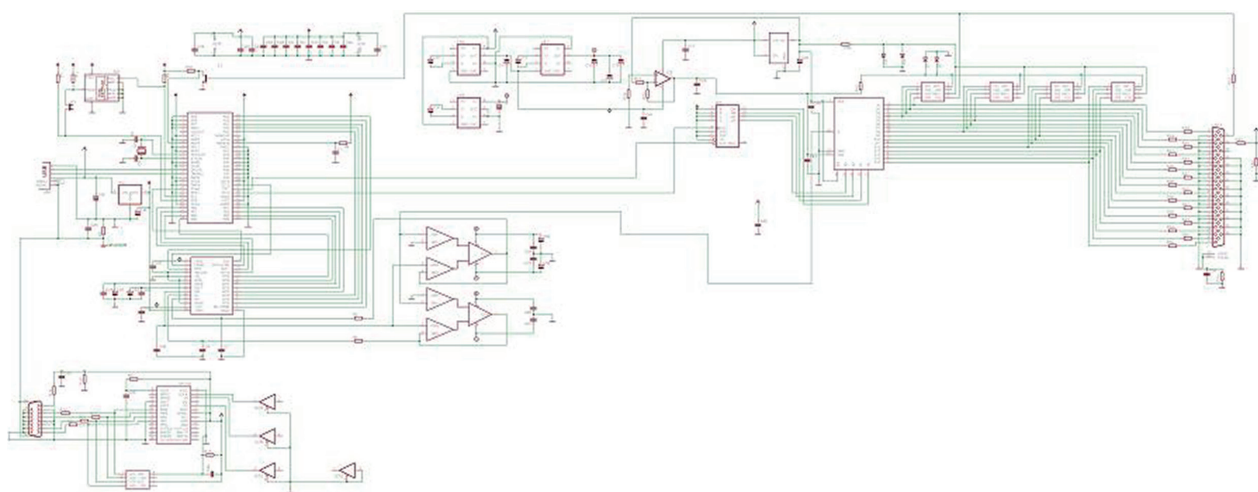


Рис. 1. Схема аналого-цифрового преобразователя *usbdux-fast*

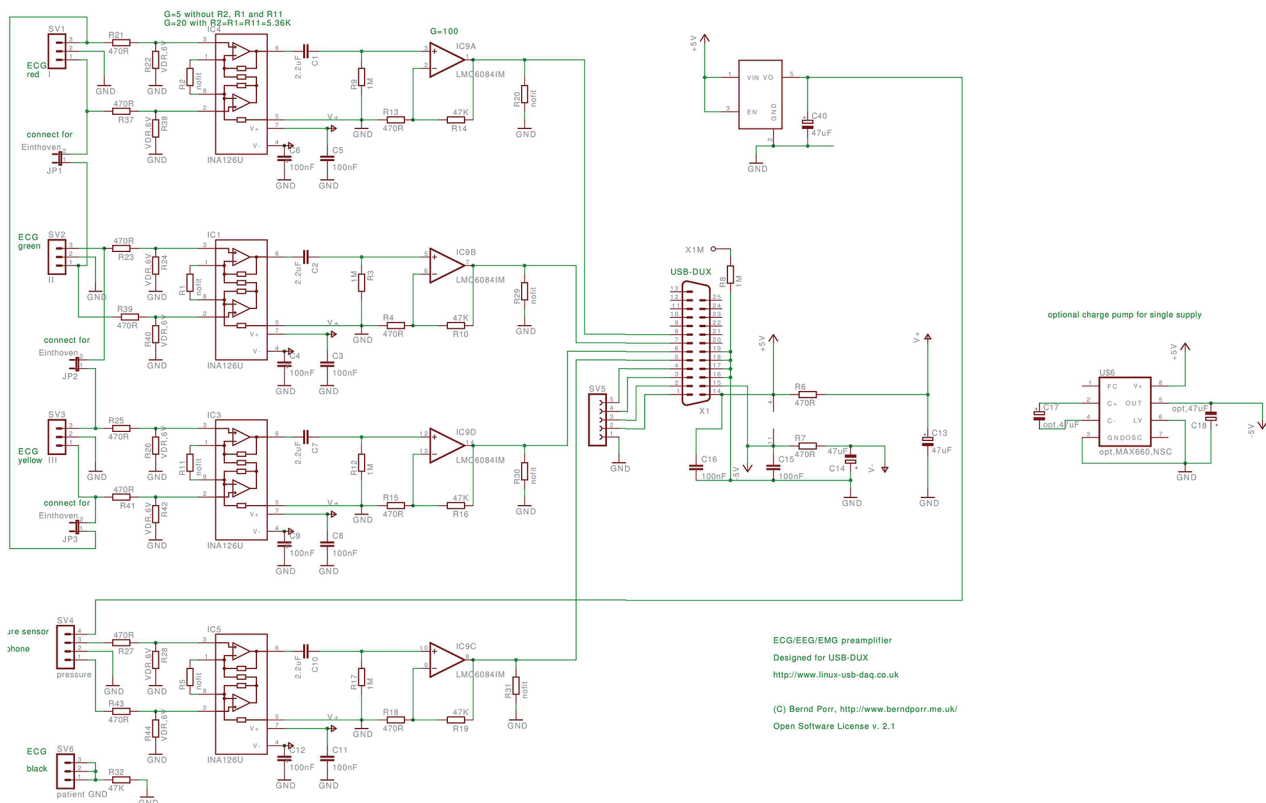


Рис. 2. Схема усилителя (коэффициент усиления $G = 1000$)

задача была решена с помощью многослойного экранирования аналоговой части системы вместе с лабораторным животным, кабелями и усилителем. Помехи от сетевого электропитания были исключены посредством питания всей установки исключительно от автономного источника постоянного тока. В ходе эксперимента также осуществлялась регистрация энцефалограммы в областях S_1HL и передней Sg правого полушария коры головного мозга с частотой дискретизации до 100 кГц, что позволило минимизировать потерю аналоговых данных об электрической активности головного мозга; кроме того, следует отметить, что при записи сигнала не использовались никакие, ни аппаратные, ни программные, фильтры. Для наблюдения входящей электроэнцефалограммы в режиме реального времени оказалось удобно использовать программу xoscope 1.12 [Witham, 2005]. Для записи регистрируемых данных нами использовалась программа ktimetrace 0.2.37 [Hess, 2005]; она позволяет записывать данные, получаемые с желаемых каналов, за заданный промежуток времени, начиная как с произвольного момента, так и с момента, определяемого подведенным к системе внешним синхронизирующим сигналом от стимулятора, подающего раздражение на экспериментальное животное. Записанные таким

образом данные составляют обычный текстовый файл, каждая строка которого представляет собой числовые значения, полученные от каналов в соответствующий момент времени. Размер файла может достигать чрезвычайно больших значений, что влечет использование соответствующей файловой системы (мы выбрали ext4).

Описанная система была успешно применена для регистрации и анализа изменений ноцицептивных ВП в S_1HL и передней Sg областях правого полушария коры головного мозга крыс до и на 1, 3 и 7-е сутки после внутрибрюшинного введения LPS при электрокожном раздражении хвоста.

Поздние компоненты ВП, в наибольшей степени отражающие эмоциональный компонент ноцицептивной реакции, анализировались по амплитудам, измеряемым от пика до пика (A), а также по площадям вторичных негативных ответов (S) [Kolchin, Ionkina, 2013].

Для решения возникшей классической задачи биостатистики определения наличия или отсутствия эффекта от однократного введения препарата нами применен непараметрический критерий Вилкоксона. В нем используется лишь информация о величинах изменений параметров и их знаках, и нет необходимости делать какие-либо предположения о законе

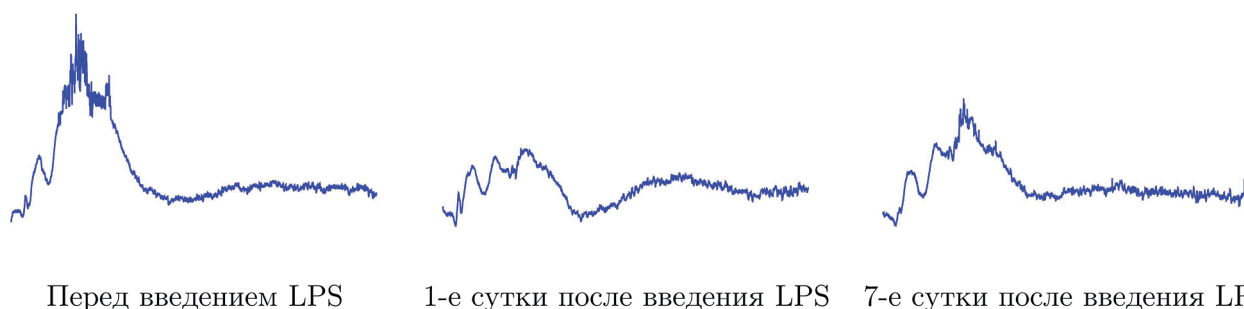


Рис. 3. Ноцицептивные ВП в области S_1HL правого полушария коры головного мозга крысы до и на 1-е и 7-е сутки после внутрибрюшинного введения LPS

распределения совокупности изменений исследуемых параметров в результате действия препарата. Параметрические критерии, основанные на нормальном приближении, здесь оказываются неприменимыми, и необходимость в них отпадает [см., напр., Glantz, 2012].

На рис. 3 приведен пример динамики ВП в области S_1HL правого полушария коры головного мозга крысы при электрокожном раздражении хвоста до и на 1-е и 7-е сутки после внутрибрюшинного введения LPS.

Особенностью данной электрофизиологической установки является высокая чувствительность (микровольт), отсутствие фильтров, а также высокое разрешение измерений, что ведет к практическому отсутствию потерь данных при регистрации биоэлектрической активности мозга в режиме реального времени.

Совокупность решений, примененных при сборке, настройке и практическом использовании настоящей системы сбора данных, обладает несомненной новизной и, мы уверены, позволит решить широкий круг задач в области электрофизиологии.

Все исследования на животных проводились согласно принципам GLP.

Литература

Glantz S. A. Primer of Biostatistics. N. Y., etc.: McGraw-Hill, 2012.

Hess F. M. KtimeTrace. 2005. URL: <http://ktimeTrace.sourceforge.net> (дата обращения: 08.02.2005).

Kolchin A. V., Ionkina E. G. On acquisition of nociceptive evoked potentials in rats cerebral cortex // Proc. 10th International Conference «Computer Data Analysis and Modeling: Theoretical and Applied Stochastics». Vol. 1. Minsk: Publishing Centre BSU, 2013. P. 72–73.

Porr B. USBDUX-fast: Product description. 2007. URL: http://linux-usb-daq.co.uk/prod2_duxfast (дата обращения: 29.04.2007).

Porr B. ECG preamplifier for the USBDUX-D. 2012. URL: <http://linux-usb-daq.co.uk/howto2/ecg> (дата обращения: 12.04.2012).

Schleef D., Hess F. M., Abbott I. Comedi: Linux control and measurement device interface. 2014. URL: <http://www.comedi.org> (дата обращения: 15.04.2014).

Witham T. Xoscope for Linux. 2005. URL: <http://xoscope.sourceforge.net> (дата обращения: 28.06.2005).

Поступила в редакцию 29.06.2015

References

Glantz S. A. Primer of Biostatistics. N. Y., etc.: McGraw-Hill, 2012.

Hess F. M. KtimeTrace. 2005. URL: <http://ktimeTrace.sourceforge.net> (accessed 08.02.2005).

Kolchin A. V., Ionkina E. G. On acquisition of nociceptive evoked potentials in rats cerebral cortex. Proc. 10th International Conference «Computer Data Analysis and Modeling: Theoretical and Applied Stochastics». Vol. 1. Minsk: Publishing Centre BSU, 2013. P. 72–73.

Porr B. USBDUX-fast: Product description. 2007. URL: http://linux-usb-daq.co.uk/prod2_duxfast (accessed 29.04.2007).

Porr B. ECG preamplifier for the USBDUX-D. 2012. URL: <http://linux-usb-daq.co.uk/howto2/ecg> (accessed 12.04.2012).

Schleef D., Hess F. M., Abbott I. Comedi: Linux control and measurement device interface. 2014. URL: <http://www.comedi.org> (accessed 15.04.2014).

Witham T. Xoscope for Linux. 2005. URL: <http://xoscope.sourceforge.net> (accessed 28.06.2005).

Received June 29, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ионкина Елена Гавриловна

доцент
Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России
ул. Моховая, д. 11, с. 4, Москва, Россия, 125009
эл. почта: helena.ionkina@gmail.com

Колчин Андрей Валентинович

эл. почта: andrei.kolchin@gmail.com
тел.: +7 925 9913498

CONTRIBUTORS:

Ionkina, Helena

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University
11-4 Mokhovaya St., 125009 Moscow, Russia
e-mail: helena.ionkina@gmail.com

Kolchin, Andrei

e-mail: andrei.kolchin@gmail.com
tel.: +7 925 9913498

УДК 581.1

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ГЛУТАТИОНСИНТЕТАЗЫ GS3 В КОРНЯХ И ЛИСТЬЯХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ КАДМИЯ

Н. С. Репкина, Ю. В. Батова, А. Ф. Титов, В. В. Таланова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучено влияние кадмия (100 мкМ) в форме сульфата на экспрессию гена GS3 глутатионсинтетазы – одного из ключевых ферментов синтеза глутатиона – в корнях и листьях проростков пшеницы. Показано, что уже в начальный период действия кадмия (через 1 ч) наблюдается его поступление в корни пшеницы и накопление в них транскриптов гена GS3. В листьях содержание мРНК гена GS3 также увеличилось достаточно быстро – через 30 мин от начала опыта, хотя накопление ионов кадмия в них зафиксировано только через 1 сут. Повышенный уровень транскриптов сохранялся и в корнях, и в листьях в течение всего эксперимента (7 сут). Анализ содержания малонового диальдегида (МДА) не выявил его накопления в корнях, а в листьях отмечено некоторое увеличение его содержания только при продолжительном действии (3–7 сут) ионов кадмия на проростки. Это свидетельствует об активации и эффективной работе антиоксидантной системы, в том числе и глутатионсинтетазы, в ответ на действие кадмия. Также не обнаружено влияния кадмия на выход электролитов из клеток листа, а следовательно, на проницаемость мембран проростков пшеницы. На основании полученных результатов сделан вывод о том, что кадмий в концентрации 100 мкМ не оказывает повреждающего действия на проростки пшеницы, а усиление образования транскриптов гена GS3, кодирующего глутатионсинтетазу, является частью адаптивного ответа, позволяющего растениям выживать и поддерживать жизнедеятельность в присутствии этого металла в окружающей среде.

Ключевые слова: кадмий; пшеница; глутатионсинтетаза; экспрессия гена GS3; МДА; проницаемость мембран.

N. S. Repkina, Yu. V. Batova, A. F. Titov, V. V. Talanova. GLUTATHIONE SYNTHETASE (GS3) GENE EXPRESSION IN THE LEAVES AND ROOTS OF WHEAT SEEDLINGS UNDER CADMIUM IMPACT

The influence of cadmium sulphate (100 µM) on GS3 gene expression encoding glutathione synthetase – one of the main enzymes of glutathione synthesis, was investigated in wheat seedling roots and leaves. After 1 hour of cadmium effect on wheat seedlings the metal was found in the roots and GS3 transcripts accumulated there. In leaves the GS3 gene mRNA content also rapidly increased (30 min after the beginning of the experiment), but cadmium accumulation there was observed only after 1 full day. The elevated transcripts level of GS3 in leaves and roots persisted throughout the experiment (7 days). The analysis of MDA content showed no accumulation in roots, and a moderate increase in leaves under long cadmium treatment (3–7 days). This is evidence of the activation and effective operation of the antioxidant defense system, including glutathione synthetase, in cadmium presence. Neither did we observe any promotion of electrolyte leakage from

leaf cells, which means membrane permeability was not affected. One can conclude from these results that cadmium in 100 μM concentration did not damage wheat seedlings, and accumulation of transcripts of the glutathione synthetase encoding *GS3* gene is a component part of the adaptation that enables the plants to survive and continue living in the presence of cadmium in the environment.

Keywords: cadmium; wheat; glutathione synthetase; *GS3* gene expression; MDA; membrane permeability.

Введение

Кадмий относится к тяжелым металлам, широко используемым в промышленности, в частности, при изготовлении солнечных батарей, аккумуляторов, ртутно-кадмиевых гальванических элементов, красок и т. д. [Khairy et al., 2014]. Являясь рассеянным и высокомолекулярным химическим элементом, он загрязняет почву, воду и воздух, откуда поглощается растениями [Clemens, 2013], вызывая различные нарушения в их обмене веществ. Для того чтобы избежать или минимизировать отрицательные последствия этого, растения используют довольно широкий арсенал защитно-приспособительных реакций, которые реализуются на разных уровнях организации и направлены прежде всего на предотвращение поступления кадмия в растение, а в случае его проникновения – на нейтрализацию [Manara, 2012; Титов и др., 2014].

Одной из первичных реакций растений на действие тяжелых металлов является усиление генерации активных форм кислорода (АФК), которое вызывает активацию антиоксидантной системы [Sharma, Dietz, 2006; Gallego et al., 2012]. К ключевым низкомолекулярным антиоксидантам относится глутатион. Помимо защиты клетки от повреждающего действия АФК, глутатион участвует в поддержании внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала, сигналинге, а также детоксикации тяжелых металлов [Noctor et al., 2012; Pivato et al., 2014]. В химическом отношении он представляет собой трипептид, состоящий из остатков трех аминокислот: цистеина, глицина и глутамина (γ -глутамилцистеинилглицин) [Carcía-Giménez et al., 2013]. Синтез глутатиона осуществляется в два этапа. Первый из них включает образование γ -глутамилцистеина из глутамата и цистеина и катализируется ферментом γ -глутамилцистеинсинтетазой. Второй этап заключается в конъюгации γ -глутамилцистеина с глицином и катализируется ферментом глутатионсинтетазой (*GS*) [Meyer, 2008; Estrella-Gomez et al., 2012]. У пшеницы синтез глутатионсинтетазы контролируют гены *GS1*, *GS2* и *GS3*,

которые являются гомологами, так как содержат в структуре гомологичную последовательность на 3' и 5' конце [Skipsey et al., 2005]. В настоящее время изучена экспрессия первых двух названных генов при действии тяжелых металлов на растения арабидопсиса, горчицы, ячменя, табака [Zhu et al., 1999; Liu et al., 2015], в то время как данные об экспрессии гена *GS3* в известной нам литературе отсутствуют. Учитывая это, цель данного исследования заключалась в изучении влияния кадмия на экспрессию гена глутатионсинтетазы *GS3* в корнях и листьях проростков пшеницы.

Материалы и методы

Исследования выполнены на приборно-аналитической базе Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

В качестве объекта исследований использовали проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39. Их выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе (рН 6,2–6,4) с добавлением микроэлементов в климатической камере при температуре воздуха 22 °С, его относительной влажности 60–70 %, освещенности около 10 клк и 14-часовом фотопериоде. По достижении недельного возраста проростки пшеницы помещали на раствор сульфата кадмия в концентрации (100 мкМ) на 7 сут, сохраняя прочие условия неизменными.

Содержание кадмия в корнях и листьях проростков определяли методом инверсионной вольтамперометрии с использованием полярографа АВС-1.1 («Вольта», Россия). Разложение растительных образцов проводили в смеси HNO_3 и H_2O_2 в соотношении 4:1 с использованием микроволновой системы пробоподготовки МС-6 («Вольта», Россия).

Накопление транскриптов гена *GS3* анализировали методом ПЦР в режиме реального времени. Для этого навеску листьев пшеницы (50 мг) растирали в жидком азоте. Тотальную

Таблица 1. Праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени

Ген	Прямой и обратный праймеры	Нуклеотидная последовательность праймера 5 ... 3	Номер доступа в базе данных NCBI
<i>Actin</i>	прямой	GGGACCTCACGGATAATCTAATG	AJ579382
	обратный	AACCTCCACTGAGAACAACATTAC	
<i>GS3</i>	прямой	AACTATTAGGAAAACCTTGTCAG	AJ579382
	обратный	GAATCTTCTTGGTCCCGACTAAA	

Таблица 2. Влияние сульфата кадмия (100 мкМ) на содержание кадмия (мкг/г сырой массы) в корнях и листьях пшеницы

Вариант	Экспозиция, часы						
	0	1	5	24	48	72	168
Корень	0,01 ± 0,01	1,20 ± 0,08	2,08 ± 0,34	10,10 ± 0,07	16,51 ± 0,28	24,78 ± 1,71	32,46 ± 2,65
Лист	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,11 ± 0,11	0,67 ± 0,02	0,86 ± 0,16	1,16 ± 0,09	4,05 ± 0,3

РНК выделяли с помощью набора РНК-Экстран («Синтол», Россия). Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывали ДНКазой (10 ед./мл) («Синтол», Россия). кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции с M-MLV обратной транскриптазой и случайными (random) гексапраймерами («Синтол», Россия). Количество и качество выделенной РНК и синтезированной кДНК проверяли спектрофотометрически (SmartSpecPlus, «Био-Рад»). Амплификацию образцов проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 («Био-Рад»), используя наборы для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green («Синтол», Россия). Смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 1 мкл кДНК (100 нг), 10 мкл реакционной смеси, по 1 мкл прямого и обратного праймеров (10 мкМ) (табл. 1), 1 мкл MgCl₂ и 17 мкл деионизованной воды, свободной от нуклеаз. В качестве референсного гена использовали актин. Протокол ПЦР: 5 мин при 95 °С, далее 45 циклов 15 с при 95 °С, 30 с при 56 °С. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР-фрагментов: 1 мин при 95 °С, 1 мин при 50 °С, 10 с при 60 °С (80 циклов, повышая в каждом цикле температуру на 0,5 °С). Накопление транскриптов генов вычисляли по формуле:

$$\text{Накопление транскриптов гена} = \frac{2^{\text{Ст (контрольный)} - \text{Ст (тестовый образец)}}}{\text{Ст}}$$

где Ст – значения пороговых циклов.

В качестве контрольных образцов были выбраны кДНК, выделенные из растений, не подвергнутых воздействию металла.

Проницаемость мембран клеток определяли кондуктометрически по выходу электролитов из высечек листьев пшеницы с использованием кондуктометра («HANNA», Италия) [Грищенко-ва, Лукаткин, 2005].

Содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), основную долю которых

составляет малоновый диальдегид (МДА), оценивали спектрофотометрически по тесту с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), основанному на образовании в кислой среде в присутствии ТБК окрашенного триметинового комплекса [Маевская, Николаева, 2013].

Повторность при анализе содержания кадмия и МДА в листьях и корнях проростков в пределах одного опыта 3-кратная, а при проведении ПЦР-анализа и исследовании проницаемости мембран 2-кратная. На рисунках приведены средние арифметические значения из двух независимых опытов и их стандартные отклонения. В статье обсуждаются величины, достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты

Проведенные исследования показали, что уже через 1 ч от начала действия сульфата кадмия в концентрации 100 мкМ происходит поступление кадмия в корни пшеницы (табл. 2), а с увеличением экспозиции наблюдается существенное увеличение его содержания в корнях, достигающее максимума (32,46 мкг/г сырой массы) к концу эксперимента. В отличие от этого в листьях накопление кадмия отмечено лишь через 1 сут от начала действия сульфата кадмия на корни (см. табл. 2). С увеличением продолжительности воздействия его содержание в листьях продолжало возрастать, но значительно уступало накоплению в корнях. Таким образом, выявлена зависимость накопления ионов кадмия в корнях и листьях пшеницы от продолжительности его воздействия.

Изучение содержания транскриптов гена *GS3* в проростках пшеницы показало, что через 1 ч от начала действия кадмия, когда обнаружено его поступление в корни, в них наблюдается накопление мРНК данного гена (рис. 1). В дальнейшем, при более продолжительном воздействии (5 ч – 7 сут) металла содержание

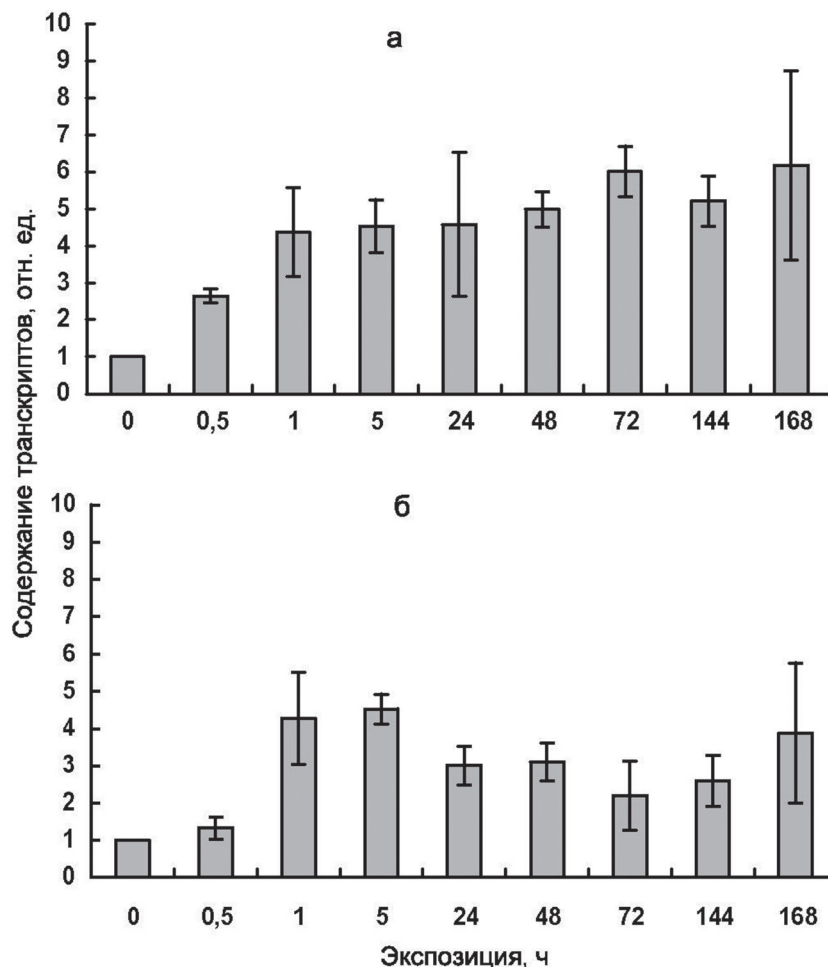


Рис. 1. Влияние сульфата кадмия (100 мкМ) на содержание транскриптов гена *GS3* в листьях (а) и корнях (б) проростков пшеницы

транскриптов гена *GS3* в корнях пшеницы сохранялось на повышенном уровне. Увеличение уровня транскриптов гена *GS3* под влиянием кадмия происходило также и в листьях проростков. Причем заметное возрастание содержания мРНК этого гена отмечено уже в начальный период действия металла (через 30 мин), а при более длительном его воздействии содержание транскриптов превышало исходный уровень в несколько раз.

Одним из показателей развития окислительного стресса у растения под влиянием различных стрессоров является накопление конечного продукта перекисного окисления липидов – МДА. В наших экспериментах кадмий не вызывал существенных изменений в содержании МДА в корнях проростков (рис. 2). В листьях проростков в начальный период действия кадмия (0,5–24 ч) накопления МДА также не зафиксировано, но при более длительном воздействии (3–7 сут) наблюдалось некоторое увеличение его содержания. Однако, учитывая, что изменения в содержании МДА как в корнях,

так и в листьях проростков были незначительными, можно предположить, что кадмий в изученной концентрации не вызывал окислительный стресс.

Анализ проницаемости мембран клеток листа пшеницы показал, что в начальный период действия сульфата кадмия (1–24 ч) происходит некоторое увеличение выхода электролитов из тканей листа. Но уже через 2 сут уровень выхода электролитов снижался и к концу эксперимента возвращался к исходному значению (рис. 3).

Таким образом, результаты изучения накопления МДА в корнях и листьях пшеницы и данные по проницаемости мембран клеток листа позволяют сделать вывод о том, что кадмий в концентрации 100 мкМ не оказывает повреждающего действия на проростки пшеницы.

Обсуждение

Поглощаясь из почвы, кадмий поступает в корни растений наряду с другими металлами, необходимыми для их нормальной

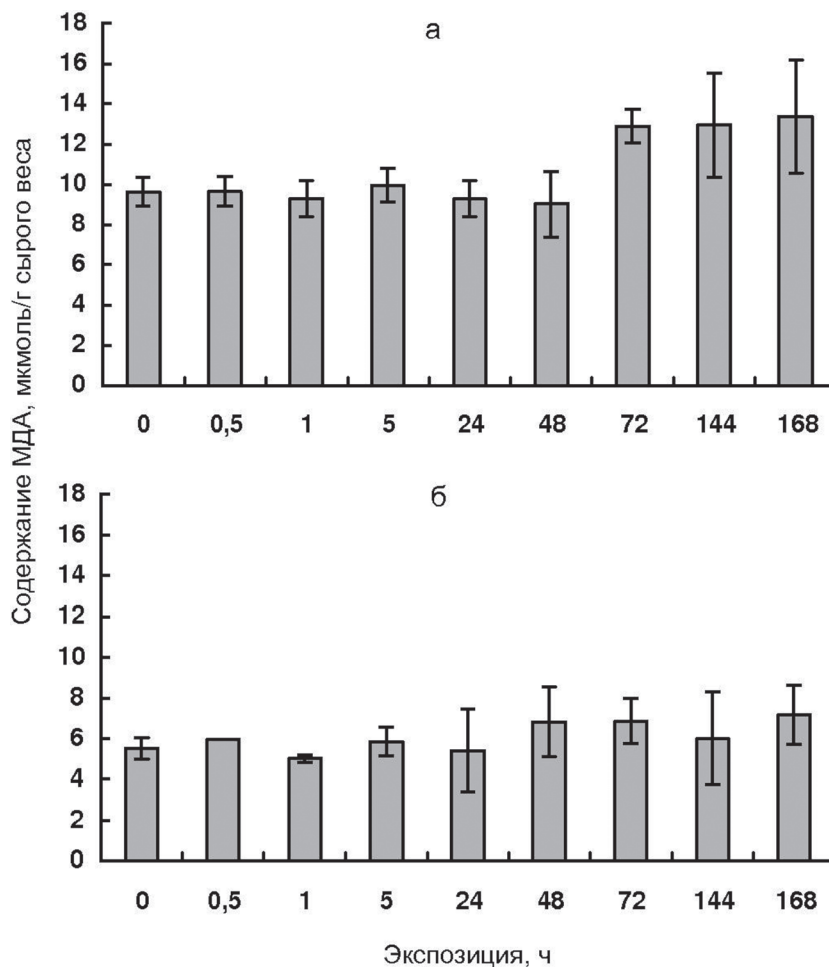


Рис. 2. Влияние сульфата кадмия (100 мкМ) на содержание МДА в листьях (а) и корнях (б) проростков пшеницы

жизнедеятельности, а затем попадает в надземную часть [Verkleij et al., 2009; Lux et al., 2011]. В нашем случае уже через 1 ч от начала опыта обнаружено поступление кадмия в корни пшеницы, а через сутки отмечено его присутствие в листьях, но заметно в меньшем количестве, чем в корнях. Эти результаты согласуются с данными, полученными на других растениях, в частности, большее накопление кадмия в корневой системе, чем в надземной части растений, отмечено у арабидопсиса [Jozefczak et al., 2014], риса [Cho et al., 2012; Sebastian, Prasad, 2014; Xue et al., 2014], ячменя [Tiryakioglu et al., 2006]. Очевидно, это связано с тем, что пшеница, так же как и указанные виды растений, относится к исключателям, т. е. к растениям, которые накапливают тяжелые металлы преимущественно в корнях [Титов и др., 2007].

Важно отметить, что через 1 ч от начала действия кадмия, когда происходит его поступление в корни проростков пшеницы, наблюдается накопление транскриптов гена *GS3*, кодирующего глутатионсинтетазу, как в корнях, так

и в листьях, которое сохраняется на повышенном уровне до конца эксперимента. Глутатионсинтетаза является одним из ключевых ферментов синтеза глутатиона [Gill et al., 2013], который локализован в хлоропластах и в цитозоле [Preuss et al., 2014]. Учитывая, что глутатион способен связываться с ионами тяжелых металлов, образуя хелатные комплексы, логично полагать, что быстрая активация гена *GS3* и последующий синтез глутатиона способствуют детоксикации кадмия в корнях, что в свою очередь приводит к сокращению его поступления в надземную часть растения.

Наблюдаемое нами быстрое повышение уровня транскриптов гена *GS3* в листьях пшеницы (еще до поступления в них кадмия) может также свидетельствовать о передаче сигнала о действии кадмия из корня в надземную часть и, как следствие, вызывать активацию защитных механизмов в тканях листа. Известно, что глутатион синтезируется преимущественно в листьях растений [Титов и др., 2014]. В пользу этого говорит наблюдаемый нами

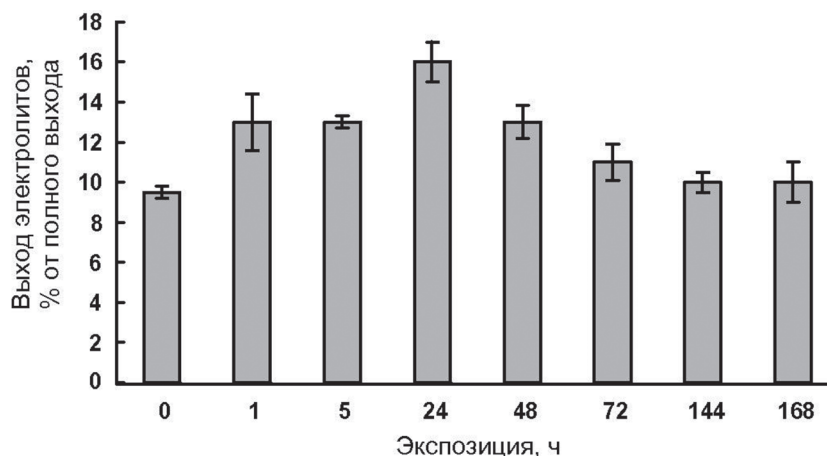


Рис. 3. Динамика выхода электролитов из клеток листьев проростков пшеницы при действии сульфата кадмия (100 мкМ)

более высокий уровень транскриптов гена *GS3* в листьях, чем в корнях. Сходные данные были получены на растении-гипераккумуляторе – *Salvinia minima*, у которого экспрессия гена *SmGS3* также была выше в листьях, чем в корнях. Наряду с усилением экспрессии гена *SmGS3* при действии кадмия наблюдается накопление глутатиона в листьях и в корнях растения *Salvinia minima* [Estrella-Gomez et al., 2012].

Помимо участия в детоксикации тяжелых металлов и сигналинге, глутатион является одним из важных низкомолекулярных антиоксидантов. В наших экспериментах при изучении динамики содержания МДА было показано, что в корнях проростков не происходит достоверных его изменений, а обнаруженное некоторое повышение содержания МДА в листьях при длительных экспозициях может быть связано с процессами старения листа [Маевская, Николаева, 2013]. Учитывая это, а также тот факт, что активное накопление транскриптов гена *GS3* в корнях и листьях растений происходит уже в начальный период действия кадмия, можно предположить, что образующийся в это время глутатион участвует в нейтрализации АФК и тем самым препятствует развитию окислительного стресса. В целом на основании совокупности полученных данных можно сделать вывод, что кадмий в концентрации 100 мкМ не оказывал повреждающего воздействия на проростки пшеницы.

Заключение

Проведенные исследования показали, что кадмий способен быстро поступать в растения пшеницы и накапливается в корнях. В отличие от корней его поступление в листья происходит значительно медленнее и в меньшей степени. Оценка реакции растений на действие кадмия по изменению проницаемости мембран

и накоплению МДА показала, что в изученной концентрации (100 мкМ) он не оказывает повреждающего действия и растения способны адаптироваться к нему. В работе впервые установлено повышение содержания мРНК гена *GS3* в корнях и листьях проростков пшеницы под влиянием кадмия, что указывает на участие этого гена в механизмах устойчивости пшеницы к кадмию. Очевидно, накопление транскриптов гена *GS3* и последующий синтез глутатиона являются важной составляющей защитных механизмов, ответственных за устойчивость пшеницы к ионам кадмия. Благодаря их активному функционированию растения способны не только выживать, но и поддерживать жизнедеятельность без существенных отклонений при повышенных концентрациях этого металла в окружающей среде.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-31676 мол_а). Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0021-2014-0002).

Литература

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.

Маевская С. Н., Николаева М. К. Реакция антиоксидантной и осмопротекторной систем проростков пшеницы на засуху и регидратацию // Физиология растений. 2013. Т. 60, № 3. С. 351–359.

Титов А. Ф., Таланова В. В., Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: Карельский НЦ РАН, 2007. 170 с.

Титов А. Ф., Казнина Н. М., Таланова В. В. Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2014. 194 с.

Carcía-Giménez J. L., Markovic J., Dasí F. et al. Nuclear glutathione // *Biochem. Biophys. Acta*. 2013. Vol. 1830. P. 3304–3316.

Cho S.-C., Chao Y.-Y., Kao C. H. Calcium deficiency increases Cd toxicity and Ca is required for heat-shock induced Cd tolerance in rice seedlings // *J. Plant Physiol.* 2012. Vol. 169. P. 892–898.

Clemens S., Aarts M. G. M., Thomine S., Verbruggen N. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning // *Trends in Plant Science*. 2013. Vol. 18, No 2. P. 92–99.

Estrella-Gomez N. E., Sauri-Duch E., Zapata-Peréz O., Santamaria J. M. Glutathione plays a role in protecting leaves of *Sedum minima* from Pb²⁺ damage associated with changes in the expression of *SmGS* genes and increased activity of GS // *Environ. Exp. Bot.* 2012. Vol. 75. P. 188–194.

Gill S. S., Hasanuzzaman M., Nahar K. et al. Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants // *Plant Physiol. Biochem.* 2013. Vol. 63. P. 254–261.

Jozefczak M., Kaunen E., Schat H. et al. Differential responses of *Arabidopsis* leaves and roots to cadmium: Glutathione-related chelating capacity vs antioxidant capacity // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. Vol. 83. P. 1–9.

Khairy M., El-Safty S. A., Shenashen M. A. Environmental remediation and monitoring of cadmium // *Trends Analyt. Chem.* 2014. Vol. 62. P. 56–68.

Liu X., Zhang S., Jeff Whitworth R., Stuart J. J., Chen M.-S. Unbalanced activation of glutathione metabolic pathway suggests potential involvement in plant defense against the cell midge *Mayetiola destructor* in wheat // *Sci. Report.* 2015. Vol. 5, No 8092. P. 1–7.

Lu S. C. Glutathione synthesis // *Biochem. Biophys. Acta*. 2013. Vol. 1830. P. 3143–3153.

Lux A., Martinka M., Vaculik M., White P. J. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review // *J. Exp. Bot.* 2011. Vol. 62, No 1. P. 21–37.

Mannara A. Plants and Heavy metals. Ed. A. Furini. The Netherlands. Springer, 2012. P. 27–53.

Meyer A. J. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling // *J. Plant Physiol.* 2008. Vol. 165. P. 1390–1403.

Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S. et al. Glutathione in plants: an integrated overview // *Plant Cell. Environ.* 2012. Vol. 35. P. 454–484.

Pivato M., Fabrega-Prats M., Masi A. Low-molecular-weight thiols in plants: Functional and analytical implications // *Arc. Biochem. Biophys.* 2014. Vol. 560. P. 83–99.

Preuss A. L., Cameron J. C., Berg R. H., Jez J. M. Immunolocalization of glutathione biosynthesis enzymes in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. Vol. 75. P. 9–13.

Sebastian A., Prasad M. N. V. Vertisol prevent cadmium accumulation in rice: Analysis by ecophysiological toxicity markers // *Chemosphere.* 2014. Vol. 108. P. 85–92.

Sharma S. S., Dietz K.-J. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress // *J. Exp. Bot.* 2006. Vol. 57, No 4. P. 711–726.

Skipsey M., Davis B. G., Edwards R. Diversification in substrate usage by glutathione synthetases from soya bean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) // *Biochem. J.* 2005. Vol. 391. P. 567–574.

Stewart R. R. C., Bewley J. D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes // *Plant Physiol.* 1980. Vol. 65. P. 245–248.

Tiryakioglu M., Eker S., Ozkutlu F., Husted S., Cakmak I. Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2006. Vol. 20. P. 181–189.

Verkleij J. A. C., Golan-Goldhirsh A., Antosiewicz D. M. et al. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts // *Environ. Exp. Bot.* 2009. Vol. 67. P. 10–22.

Xue D., Jiang H., Deng X. et al. Comparative proteomic analysis provides new insights into cadmium accumulation in rice grain under cadmium stress // *J. Hazard. Mater.* 2014. Vol. 280. P. 269–278.

Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Jouanin L., Terry N. Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance // *Plant Physiol.* 1999. Vol. 119. P. 73–79.

Поступила в редакцию 03.08.2015

References

Grishenkova N. N., Lukatkin A. S. Opređenje usvojivosti rastitel'nyh tkanej k abiotičeskim stressam s ispol'zovaniem konduktometričeskogo metoda. [A conductometric technique to estimate the plant tissues stability to abiotic stresses]. *Povolzhskij jeologičeskij [Povolzhskiy Journal of Ecology]*. 2005. No 1. P. 3–11.

Maevskaja S. N., Nikolaeva M. K. Reakcija antioksidantnoj i osmoprotektojnij sistem prorostkov pšenicy na zasuhu i regidraciju [Response of antioxidant and osmoprotective systems of wheat seedlings to drought and rehydration]. *Fiziologija rastenij*. 2013. Vol. 60, No 3. P. 351–359.

Titov A. F., Talanova V. V., Kaznina N. M., Lajdinen G. F. Ustojčivost' rastenij k tjazhelym metallam [Resistance of plants to heavy metals]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2007. 170 p.

Titov A. F., Kaznina N. M., Talanova V. V. Tjazhelye metally i rastenija [Heavy metals and plants]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2014. 194 p.

Carcía-Giménez J. L., Markovic J., Dasí F., Queval G., Schnaubelt D., Foyer C. H., Pallardó F. V. Nuclear glutathione. *Biochem. Biophys. Acta*. 2013. Vol. 1830. P. 3304–3316.

Cho S.-C., Chao Y.-Y., Kao C. H. Calcium deficiency increases Cd toxicity and Ca is required for heat-shock

induced Cd tolerance in rice seedlings. *J. Plant Physiol.* 2012. Vol. 169. P. 892–898.

Clemens S., Aarts M. G. M., Thomine S., Verbruggen N. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science.* 2013. Vol. 18, No 2. P. 92–99.

Estrella-Gomez N. E., Sauri-Duch E., Zapata-Perez O., Santamaria J. M. Glutathione plays a role in protecting leaves of *Sedum minima* from Pb²⁺ damage associated with changes in the expression of *SmGS* genes and increased activity of GS. *Environ. Exp. Bot.* 2012. Vol. 75. P. 188–194.

Gill S. S., Hasanuzzaman M., Nahar K., Macovei A., Tuteja N. Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* Vol. 63. P. 254–261.

Jozefczak M., Kaunen E., Schat H., Bliet M., Hernandez L. E., Carleer R., Remans T., Bohler S., Vangronsveld J., Cuypers A. Differential responses of *Arabidopsis* leaves and roots to cadmium: Glutathione-related chelating capacity vs antioxidant capacity. *Plant Physiol. Biochem.* 2014. Vol. 83. P. 1–9.

Khairy M., El-Safty S. A., Shenashen M. A. Environmental remediation and monitoring of cadmium. *Trends Analyt. Chem.* 2014. Vol. 62. P. 56–68.

Liu X., Zhang S., Jeff Whitworth R., Stuart J. J., Chen M.-S. Unbalanced activation of glutathione metabolic pathway suggests potential involvement in plant defense against the cell midge *Mayetiola destructor* in wheat. *Sci. Report.* 2015. Vol. 5, No 8092. P. 1–7.

Lu S. C. Glutathione synthesis. *Biochem. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1830. P. 3143–3153.

Lux A., Martinka M., Vaculik M., White P. J. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *J. Exp. Bot.* 2011. Vol. 62, No 1. P. 21–37.

Mannara A. Plants and Heavy metals. Ed. A. Furini. The Netherlands. Springer, 2012. P. 27–53.

Meyer A. J. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J. Plant Physiol.* 2008. Vol. 165. P. 1390–1403.

Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C. H. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* 2012. Vol. 35. P. 454–484.

Pivato M., Fabrega-Prats M., Masi A. Low-molecular-weight thiols in plants: Functional and analytical implications. *Arc. Biochem. Biophys.* 2014. Vol. 560. P. 83–99.

Preuss A. L., Cameron J. C., Berg R. H., Jez J. M. Immunolocalization of glutathione biosynthesis enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 2014. Vol. 75. P. 9–13.

Sebastian A., Prasad M. N. V. Vertisol prevent cadmium accumulation in rice: Analysis by ecophysiological toxicity markers. *Chemosphere.* 2014. Vol. 108. P. 85–92.

Sharma S. S., Dietz K.-J. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.* 2006. Vol. 57, No 4. P. 711–726.

Skipsey M., Davis B. G., Edwards R. Diversification in substrate usage by glutathione synthetases from soya bean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*). *Biochem. J.* 2005. Vol. 391. P. 567–574.

Stewart R. R. C., Bewley J. D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* 1980. Vol. 65. P. 245–248.

Tiryakioglu M., Eker S., Ozkutlu F., Husted S., Cakmak I. Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2006. Vol. 20. P. 181–189.

Verkleij J. A. C., Golan-Goldhirsh A., Antosiewicz D. M., Schwitzguebel J.-P., Schröder P. Dualities in plant tolerance to polulutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environ. Exp. Bot.* 2009. Vol. 67. P. 10–22.

Xue D., Jiang H., Deng X., Zhang X., Wang H., Xu X., Hu J., Zeng D., Guo L., Qian Q. Comparative proteomic analysis provides new insights into cadmium accumulation in rice grain under cadmium stress. *J. Hazard. Mater.* 2014. Vol. 280. P. 269–278.

Zhu Y. L., Pilon-Smits E. A. H., Jouanin L., Terry N. Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 1999. Vol. 119. P. 73–79.

Received August 03, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Репкина Наталья Сергеевна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: nrt9@ya.ru
тел.: (8142) 762712

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

CONTRIBUTORS:

Repkina, 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

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

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

Таланова Вера Викторовна

главный научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: talanova@krc.karelia.ru
тел.: (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

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

УДК 577.115:594.124

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА ЛИПИДОВ МИДИЙ *MYTILUS EDULIS* L. В РЕЗУЛЬТАТЕ АККЛИМАЦИИ К ЛАБОРАТОРНЫМ УСЛОВИЯМ

Н. Н. Фокина, Т. Р. Руоколайнен, Н. Н. Немова, И. Н. Бахмет

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Исследование компенсаторных изменений в составе липидов и их жирных кислот у мидий *Mytilus edulis* L. в результате их акклимации к лабораторным условиям с использованием искусственного корма в качестве источника пищи показало органоспецифические особенности в ассимиляции и модификации липидов преимущественно на уровне их жирнокислотного спектра. Установлено, что жирнокислотный состав фосфолипидов жабр практически не зависит от источника пищи, тогда как жирнокислотный состав триацилглицеринов достаточно точно отражает спектр трофических жирных кислот. В гепатопанкреасе акклимированных мидий отмечены значительные изменения в составе основных фракций липидов и их жирных кислот, вызванные, по-видимому, недостатком эссенциальных фитопланктонных полиеновых n-3 жирных кислот в исследуемом корме. Вместе с тем повышенное содержание в используемом корме высокоэнергетических липидов (триацилглицеринов), обогащенных короткоцепочечными насыщенными жирными кислотами, а также α -линоленовой и вакценовой кислотами, способствовало накоплению данных липидов в исследуемых тканях мидий.

Ключевые слова: фосфолипиды; триацилглицерины; жирные кислоты; акклимация; питание; моллюски.

N. N. Fokina, T. R. Ruokolainen, N. N. Nemova, I. N. Bakhmet. ALTERATION OF THE LIPID COMPOSITION IN BLUE MUSSELS, *MYTILUS EDULIS* L., AS A RESULT OF THEIR ACCLIMATION TO LABORATORY CONDITIONS

Organ-specific modifications and assimilation of trophic lipids, primarily of their fatty acids, were shown in the study of compensatory lipid and fatty acid composition changes in blue mussels, *Mytilus edulis* L., as a result of acclimation to laboratory conditions using commercial plankton-based food. It was found that the phospholipid fatty acid composition of mussel gills did not depend on food source, whereas triacylglycerol fatty acid composition accurately reflected the trophic fatty acid profile. Significant changes in the content of the main lipid fractions and their fatty acids in digestive glands of the acclimated mussels were apparently caused by the lack of essential phytoplankton polyene n-3 fatty acids in the feed. On the other hand, increased concentration of triacylglycerols enriched with short-chain saturated fatty acids, α -linolenic and vaccenic acids in the commercial feed promoted the accumulation of these lipids in the investigated mussel tissues.

Key words: phospholipids; triacylglycerols; fatty acids; acclimation; feeding; Bivalvia.

Введение

Двустворчатые моллюски *Mytilus edulis* (L., 1758) в качестве модельного объекта используются в полевых и экспериментальных исследованиях, направленных на изучение механизмов адаптации к факторам окружающей среды различной природы [Viarengo, Canesi, 1991; Widdows, Donkin, 1992]. Перемещение животного из естественной среды обитания в лабораторные условия для проведения дальнейших экспериментальных исследований сопровождается запуском в организме акклимационных механизмов. Различные пути метаболизма, участвующие в процессах акклимации, регулируются на уровне структурной организации мембран, активности ряда ферментов, а также на уровне транскрипции и трансляции, независимо от воздействующего фактора среды [Hochachka, Somero, 2002; Озернюк, 2003].

Известно, что при адаптации организмов к новым условиям обитания важная роль принадлежит липидам [Hochachka, Somero, 2002]. По изменениям состава липидов можно судить о перестройках не только на уровне структурной организации мембран, регулирующей активность мембранно-связанных ферментов, ионных каналов и рецепторов, но и об использовании энергетических ресурсов организма при развитии компенсаторных метаболических альтераций, направленных на адаптацию организма к новым условиям окружающей среды. Необходимо отметить, что значительные изменения в составе высокоэнергетических липидов в организме двустворчатых моллюсков происходят в условиях ограниченного доступа пищи в экспериментальных условиях [Baune, 1973; Thompson et al., 1974]. Возможным решением этой проблемы может служить использование в качестве источника пищи в лабораторных условиях монокультур фитопланктона [Thompson et al., 1974; Khardin et al., 2003; Pettersen et al., 2010], а также искусственных кормов [Trevisan et al., 2012, 2014; Nogueira et al., 2015; Fokina et al., 2015]. Однако применение искусственного корма может изменить баланс состава липидов и их жирных кислот у двустворчатых моллюсков, сформированный в естественной среде обитания, что в свою очередь может отразиться на адаптивных возможностях их липидного метаболизма. Как известно, у *Bivalvia* синтез полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) ограничен или невозможен [Viso, Marty, 1993; Zhukova et al., 1998], они получают эти кислоты с пищей (т. е. в составе сестона). Более того, жирнокислотный спектр двустворчатых фильтрующих моллюсков, как и всех консументов, служит

трофическим маркером, отражающим состав их пищи, и включает в себя биохимические маркеры всех компонентов сестона, в частности фитопланктона, зоопланктона и бактерий (детрита) [Freites et al., 2002; Alkanani et al., 2007].

Цель настоящей работы заключалась в изучении модификаций на уровне липидного и жирнокислотного спектра жабр и гепатопанкреаса *M. edulis* Белого моря, вызванных акклимацией моллюсков к лабораторным условиям с использованием искусственного корма в качестве источника пищи.

Материалы и методы

Сбор мидий *Mytilus edulis* (L., 1758) (длина раковины 50–60 мм) проводился с искусственных субстратов производственной базы по выращиванию мидий в районе Сонострова, Кандалакшский залив, Белое море (66°09'00"N, 34°10'00"E). Эксперимент был проведен на базе Беломорской биологической станции «Картеш» ЗИН РАН (Кандалакшский залив, Белое море). В ходе эксперимента мидии находились в аквариумах с аэрируемой водой температурой 15 °С в течение 14 суток. Два раза в сутки на протяжении всего эксперимента осуществляли кормление моллюсков кормом для фильтрующих организмов Sera «Coraliquid» (Germany, <http://www.sera.de>, 52518, Heinsberg). Воду в аквариумах меняли ежедневно. Мидии, собранные из естественной среды обитания (температура морской воды составляла 15 °С), были использованы в качестве контрольных образцов. По истечении эксперимента ткани жабр и гепатопанкреаса мидий отбирали и фиксировали в 96%-м этаноле, хранили при +4 °С для дальнейшего биохимического анализа состава липидов и их жирных кислот ($n = 5$). Для получения проб сестона нативную морскую воду, предварительно профильтрованную (100 мкм), объемом 30 л, осаждали под вакуумом (0,6 атм) на стекловолокнистые фильтры Whatman GF/C. Пробы сестона и искусственного корма «Coraliquid» фиксировали 96%-м этанолом для последующего определения их липидного и жирнокислотного состава.

Анализ состава общих липидов

Результаты данного исследования получены при использовании оборудования ЦКП ИО Института биологии КарНЦ РАН.

Общие липиды

Липиды жабр и гепатопанкреаса *M. edulis*, а также корма «Coraliquid» (Sera) и сестона

Таблица 1. Содержание различных фракций общих липидов (% сухой массы) и их жирных кислот (% суммы ЖК) в сестоне Белого моря и корме «Coraliquid» (Sera, Germany)

Фракции общих липидов (% сухой массы)	Сестон Белого моря		Корм «Coraliquid»	
	Фракция ФЛ	Фракция ТАГ	Фракция ФЛ	Фракция ТАГ
общие липиды	15,4 ± 5,1		15,4 ± 3,1	
триацилглицерины	0,4 ± 0,4		8,9 ± 4,2*	
эфиры холестерина	1,2 ± 1,2		1,2 ± 1,2	
холестерин	8,8 ± 5,2		0,7 ± 0,7*	
фосфолипиды:	5,0 ± 2,9		4,6 ± 3,6	
фосфатидинозитол	0,05 ± 0,0		0,15 ± 0,1	
фосфатидилсерин	0,42 ± 0,2		0,31 ± 0,3	
фосфатидилэтанолламин	1,20 ± 0,8		2,00 ± 2,0	
фосфатидилхолин	2,31 ± 1,2		0,85 ± 0,8*	
лизофосфатидилхолин	0,60 ± 0,3		0,16 ± 0,1*	
сфингомиелин	0,21 ± 0,1		0,08 ± 0,08	
Жирные кислоты (% суммы ЖК)	Фракция ФЛ	Фракция ТАГ	Фракция ФЛ	Фракция ТАГ
12:0	1,4 ± 1,1	0,3 ± 0,2	4,1 ± 1,7*	5,4 ± 2,4*
14:0	2,4 ± 2,2	1,4 ± 1,1	3,0 ± 1,5	3,7 ± 1,6*
16:0	14,0 ± 4,4	20,4 ± 7,7	21,5 ± 5,8*	18,4 ± 5,9
18:0	8,6 ± 5,2	10,9 ± 3,5	10,3 ± 2,6	6,8 ± 1,5*
20:0	1,0 ± 0,4	1,6 ± 0,9	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,2*
22:0	0,3 ± 0,1	1,1 ± 0,7	7,0 ± 3,1*	5,0 ± 5,1
24:0	0,7 ± 0,3	1,4 ± 0,8	0,3 ± 0,1*	0,3 ± 0,06*
Σ НЖК	30,2 ± 7,8	39,0 ± 9,6	48,3 ± 5,9*	42,4 ± 8,3
16:1n-9	8,7 ± 8,0	7,6 ± 7,0	3,7 ± 3,2	2,0 ± 0,8
16:1n-7	5,7 ± 3,7	6,2 ± 3,0	5,8 ± 2,3	8,1 ± 2,8
18:1n-9	12,0 ± 4,7	15,9 ± 5,7	11,5 ± 2,4	7,4 ± 2,9*
18:1n-7	2,7 ± 1,1	2,9 ± 1,7	5,3 ± 2,3*	9,6 ± 2,0*
20:1n-11	0,9 ± 0,9	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1*	0,5 ± 0,1*
20:1n-9	1,3 ± 0,5	0,7 ± 0,5	0,7 ± 0,2*	1,3 ± 0,5*
20:1n-7	0,3 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,1*	0,9 ± 0,5*
22:1n-9	0,9 ± 0,6	0,3 ± 0,2	1,1 ± 1,0	1,4 ± 1,4
Σ МНЖК	37,5 ± 10,8	39,7 ± 9,3	30,8 ± 5,3	33,9 ± 3,9
18:3n-3	0,9 ± 0,8	0,1 ± 0,07	1,5 ± 1,1*	0,5 ± 0,3*
18:4n-3	2,1 ± 1,2	0,6 ± 0,4	0,2 ± 0,07*	1,1 ± 0,8
20:3n-3	0,7 ± 0,7	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,05*	1,1 ± 0,4*
20:4n-3	2,0 ± 0,9	2,9 ± 2,1	0,1 ± 0,1*	0,1 ± 0,02*
20:5n-3	6,5 ± 2,9	6,1 ± 5,8	2,3 ± 1,0*	4,1 ± 2,7
22:5n-3	1,5 ± 1,1	0,7 ± 0,3	0,2 ± 0,1*	0,6 ± 0,2
22:6n-3	6,5 ± 2,9	1,8 ± 1,2	2,6 ± 1,1*	3,5 ± 2,6
Σ n-3 ПНЖК	22,4 ± 5,0	13,2 ± 7,0	9,2 ± 4,0*	11,9 ± 6,5
18:2n-6	2,1 ± 0,8	2,4 ± 0,9	5,8 ± 2,7*	4,2 ± 1,4*
18:3n-6	0,7 ± 0,4	0,9 ± 0,4	0,8 ± 0,3	1,2 ± 0,5
20:2n-6	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1*	0,4 ± 0,2
20:3n-6	0,7 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1*	0,2 ± 0,1*
20:4n-6	1,3 ± 0,8	0,9 ± 0,6	1,3 ± 1,2	1,0 ± 0,5
22:2n-6	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,4
22:3n-6	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,1 ± 0,06*	0,4 ± 0,2
22:4n-6	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,05*	0,2 ± 0,2
22:5n-6	0,6 ± 0,6	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,04*	0,5 ± 0,2
Σ n-6 ПНЖК	7,0 ± 1,8	6,3 ± 1,5	9,1 ± 4,1	8,6 ± 1,9*
Σ НМРЖК	1,8 ± 0,6	1,5 ± 1,4	2,4 ± 2,3	0,9 ± 0,4
Σ ПНЖК	32,3 ± 6,3	19,8 ± 8,1	18,6 ± 5,8*	22,8 ± 8,8
НЖК/ПНЖК	1,0 ± 0,3	2,3 ± 1,1	2,8 ± 0,9*	2,3 ± 1,5
n-3/n-6	3,3 ± 0,8	2,1 ± 0,8	1,1 ± 0,5*	1,3 ± 0,4*

Примечание. Здесь и в табл. 3: ФЛ – фосфолипиды, ТАГ – триацилглицерины; ЖК – жирные кислоты; НЖК – насыщенные жирные кислоты; МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; НМРЖК – неметиленразделенные жирные кислоты. Здесь и в табл. 2, 3: *различия достоверны ($p < 0,05$), непараметрический критерий U Манна–Уитни.

Белого моря экстрагировали по методу Folch et al. [1957]. Разделение общих липидов проводили методом тонкослойной хроматографии с использованием пластинок «Silufol» (Россия). Количественное содержание общих фосфолипидов, триацилглицеринов и эфиров холестерина определяли гидроксаматным методом [Сидоров и др., 1972], холестерина – по методу Engelbrecht et al. [1974].

Жирнокислотный спектр

Отдельные фракции общих липидов (фосфолипиды и триацилглицерины) подвергали прямому метанолизу [Цыганов, 1971]. Полученные смеси метиловых эфиров жирных кислот разделяли методом газожидкостной хроматографии на приборе «Хроматэк Кристалл-5000.1» (Россия).

Состав отдельных фракций фосфолипидов

Фракционный анализ отдельных фракций фосфолипидов осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе «Стайер» (Россия) по методу Arduini et al. [1996].

Статистическая обработка данных

Достоверность различий липидного и жирнокислотного состава в жабрах и гепатопанкреасе у мидий до и после акклимации к лабораторным условиям оценивалась с помощью непараметрического критерия U Манна–Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ сестона Белого моря и корма для морских фильтрующих организмов

«Coraliquid» (Sera, Germany) выявил значительные различия в их липидном и жирнокислотном составе, которые в свою очередь отразились на липидном профиле мидий, акклимированных к лабораторным условиям с применением данного корма в качестве источника пищи для моллюсков. Корм «Coraliquid» характеризовался повышенным содержанием высокоэнергетической фракции – триацилглицеринов и низким уровнем основных мембранных липидных фракций – холестерина и фосфатидилхолина (табл. 1). Жирнокислотный спектр фосфолипидов и триацилглицеринов «Coraliquid» отличался повышенным содержанием насыщенных жирных кислот (НЖК), в частности 12:0, 14:0, 16:0 и 22:0, мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) – 18:1n-7 и 20:1n-7, а также эссенциальных α -линоленовой 18:3n-3 и линолевой 18:2n-6 кислот. Кроме того, в триацилглицеринах корма «Coraliquid», в отличие от сестона, отмечалось повышенное содержание МНЖК – 20:1n-11 и 20:1n-9. Вместе с тем в жирнокислотном спектре сестона Белого моря отмечалось преобладание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) n-3 семейства (18:4, 20:4, 20:5, 22:5 и 22:6) и n-6 семейства (20:2, 20:3, 22:3, 22:4 и 22:5), которые, как известно, поступают моллюскам в составе фитопланктона [Viso, Marty, 1993; Freitas et al., 2002; Alkanani et al., 2007].

Выявленные особенности спектра липидов в корме «Coraliquid» отразились в большей степени на составе общих липидов и их жирных кислот гепатопанкреаса акклимированных к лабораторным условиям мидий, в отличие от жабр. Однако высокое содержание в «Coraliquid» высокоэнергетических липидов – триацилглицеринов, обогащенных короткоцепочечными насыщенными 12:0 и 14:0 кислотами, моноеновыми 18:1n-7 и 20:1n-7 и α -линоленовой 18:3n-3 кислотами, по сравнению с сестоном

Таблица 2. Состав липидов (% сухой массы) и жирных кислот фосфолипидов (% суммы ЖК) жабр и гепатопанкреаса у мидий *M. edulis* до и после акклимации к лабораторным условиям

Фракции общих липидов (% сухой массы)	жабры		гепатопанкреас	
	До акклимации	После акклимации (14 суток)	До акклимации	После акклимации (14 суток)
Общие липиды	9,5 ± 1,0	15,3 ± 2,5*	15,5 ± 1,7	22,2 ± 2,8*
триацилглицерины	1,3 ± 0,4	3,9 ± 1,5*	4,8 ± 2,1	12,3 ± 4,3*
эфиры холестерина	1,5 ± 0,5	3,7 ± 0,6*	3,8 ± 0,5	3,2 ± 1,7
холестерин	3,3 ± 1,5	3,8 ± 0,2	2,9 ± 0,4	2,0 ± 0,5*
фосфолипиды:	3,4 ± 0,9	3,9 ± 1,5	3,9 ± 0,9	4,6 ± 1,1
фосфатидилинозитол	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,4	0,9 ± 0,6	0,2 ± 0,1*
фосфатидилсерин	0,1 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,15 ± 0,04	0,11 ± 0,04
фосфатидилэтаноламин	0,14 ± 0,05	0,13 ± 0,05	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,08
фосфатидилхолин	1,1 ± 0,6	1,7 ± 0,9	1,3 ± 0,6	1,7 ± 0,7
лизофосфатидилхолин	0,6 ± 0,4	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,1	1,7 ± 0,4*
сфингомиелин	0,03 ± 0,02	0,00 ± 0,0	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01

Таблица 3. Состав жирных кислот фосфолипидов и триацилглицеринов (% суммы ЖК) жабр и гепатопанкреаса у мидий *M. edulis* до и после акклимации к лабораторным условиям

Жирные кислоты (% от суммы ЖК)	Жабры				Гепатопанкреас			
	Фракция ФЛ		Фракция ТАГ		Фракция ФЛ		Фракция ТАГ	
	До акклимации	После акклимации (14 суток)	До акклимации	После акклимации (14 суток)	До акклимации	После акклимации (14 суток)	До акклимации	После акклимации (14 суток)
12:0	0,8 ± 0,6	1,5 ± 0,8	1,6 ± 0,4	5,1 ± 2,5*	0,3 ± 0,1	3,1 ± 0,9*	0,2 ± 0,06	0,1 ± 0,06*
14:0	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,4	0,8 ± 0,3	3,3 ± 2,1*	0,5 ± 0,4	3,3 ± 0,8*	0,1 ± 0,05	4,5 ± 1,2*
16:0	8,9 ± 3,9	7,9 ± 1,3	10,8 ± 3,2	14,8 ± 3,9	15,2 ± 2,8	5,6 ± 0,7*	15,6 ± 0,9	16,9 ± 1,9
18:0	1,8 ± 0,2	2,7 ± 0,5*	2,7 ± 0,7	6,2 ± 1,6*	7,3 ± 3,5	1,6 ± 0,5*	3,8 ± 0,4	3,7 ± 0,7
20:0	0,1 ± 0,07	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	4,2 ± 1,6	1,8 ± 0,4*	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,08
22:0	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,9	0,4 ± 0,1	1,4 ± 1,0*	2,2 ± 1,8	0,2 ± 0,03*	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,08
24:0	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,05	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,4	0,2 ± 0,09*	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,08*
Σ НЖК	13,3 ± 4,0	15,3 ± 1,7	18,3 ± 4,5	33,3 ± 6,4*	31,5 ± 5,9	16,7 ± 2,4*	21,7 ± 0,8	26,3 ± 3,3*
16:1n-9	2,5 ± 1,5	1,8 ± 1,1	2,6 ± 1,9	5,7 ± 7,3	1,0 ± 0,5	0,8 ± 0,4	0,5 ± 0,02	1,3 ± 0,6
16:1n-7	4,5 ± 2,8	3,8 ± 3,8	6,5 ± 6,5	2,9 ± 1,5	3,7 ± 1,4	12,5 ± 4,8*	10,0 ± 1,6	10,9 ± 2,1
18:1n-9	3,2 ± 1,1	4,7 ± 1,0	5,9 ± 1,3	8,5 ± 3,7	8,3 ± 4,2	2,8 ± 0,6*	4,6 ± 0,7	4,5 ± 0,8
18:1n-7	2,2 ± 1,0	3,4 ± 2,1	5,0 ± 5,0	4,7 ± 4,7	1,9 ± 0,5	8,9 ± 3,7*	3,4 ± 0,3	4,9 ± 1,2*
20:1n-11	2,7 ± 0,9	3,2 ± 1,3	2,1 ± 1,2	1,2 ± 0,5	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,4	0,9 ± 0,05	0,9 ± 0,1
20:1n-9	3,8 ± 1,0	3,3 ± 0,8	2,8 ± 0,7	2,6 ± 0,5	1,9 ± 0,7	1,8 ± 0,9	2,4 ± 0,4	2,8 ± 0,9
20:1n-7	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2*	0,6 ± 0,4	0,7 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,3 ± 0,3
22:1n-9	1,0 ± 0,7	1,0 ± 1,0	1,2 ± 1,2	0,7 ± 0,5	0,3 ± 0,07	1,4 ± 0,5*	0,2 ± 0,07	0,4 ± 0,1
Σ МНЖК	21,1 ± 4,7	23,7 ± 7,1	28,6 ± 12,4	29,6 ± 12,0	20,2 ± 4,6	31,2 ± 8,1*	25,4 ± 2,2	29,2 ± 1,1*
18:3n-3	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,03	0,6 ± 0,5	0,8 ± 0,3	0,2 ± 0,09	0,7 ± 0,4*	0,2 ± 0,03	0,3 ± 0,08*
18:4n-3	0,8 ± 0,6	0,9 ± 0,6	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,5	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,5	6,2 ± 0,7	4,9 ± 2,1
20:3n-3	0,1 ± 0,04	0,06 ± 0,02*	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,06	0,1 ± 0,03	0,3 ± 0,05	0,3 ± 0,08
20:4n-3	0,2 ± 0,08	0,2 ± 0,02	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,06	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,07	0,6 ± 0,06	0,6 ± 0,1
20:5n-3	6,2 ± 4,4	7,0 ± 2,5	10,5 ± 3,1	6,9 ± 4,0	12,3 ± 4,8	10,3 ± 2,5	15,9 ± 1,7	12,3 ± 1,7*
22:5n-3	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,3	1,3 ± 0,5	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,2*	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1
22:6n-3	7,9 ± 5,4	8,9 ± 3,1	15,4 ± 3,5	8,5 ± 4,0*	9,6 ± 2,9	10,7 ± 3,2	12,4 ± 0,7	9,9 ± 1,2*
Σ n-3 ПНЖК	29,4 ± 9,3	26,8 ± 4,7	29,9 ± 6,1	19,7 ± 8,0*	27,5 ± 8,9	32,8 ± 10,2	37,1 ± 2,5	30,1 ± 2,9*
18:2n-6	0,9 ± 0,3	1,7 ± 0,4	2,1 ± 0,4	3,4 ± 1,5	7,4 ± 2,4	1,9 ± 0,2*	3,9 ± 0,4	3,4 ± 0,2
18:3n-6	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,4	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,3	2,9 ± 0,1	2,7 ± 0,2*
20:2n-6	1,0 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1*	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2
20:3n-6	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,04	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
20:4n-6	3,2 ± 1,8	2,9 ± 1,1	5,0 ± 1,4	3,9 ± 1,7	4,9 ± 3,4	2,5 ± 0,9	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1*
22:2n-6	4,3 ± 0,5	3,3 ± 0,8*	1,8 ± 0,9	0,8 ± 0,2*	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,4	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
22:3n-6	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,4	1,9 ± 1,0*	0,7 ± 0,4	0,3 ± 0,04	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
22:4n-6	0,4 ± 0,07	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,5	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,05*	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,08
22:5n-6	0,5 ± 0,05	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,08
Σ n-6 ПНЖК	11,1 ± 2,8	10,5 ± 2,7	13,5 ± 2,2	13,2 ± 2,6	16,9 ± 4,8	8,1 ± 1,7*	11,6 ± 0,8	10,5 ± 0,5*
Σ НМРЖК	21,6 ± 4,6	18,2 ± 1,4	9,5 ± 4,6	4,1 ± 1,1*	3,1 ± 0,9	9,9 ± 5,7*	3,9 ± 0,6	3,8 ± 0,1
Σ ПНЖК	44,1 ± 6,7	42,8 ± 8,9	43,6 ± 8,1	33,1 ± 10,1*	45,1 ± 8,9	42,2 ± 12,1	48,9 ± 2,2	40,8 ± 2,6*
НЖК/ПНЖК	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,4*	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,1*	0,4 ± 0,03	0,7 ± 0,1*
n-3/n-6	2,7 ± 1,1	2,7 ± 0,6	2,2 ± 0,2	1,5 ± 0,5*	1,7 ± 0,8	3,9 ± 0,6*	3,2 ± 0,4	2,9 ± 0,4

Белого моря (см. табл. 1), способствовало повышению их уровня как в жабрах, так и в гепатопанкреасе мидий (табл. 2 и 3). Акклимация к лабораторным условиям, а также низкое содержание холестерина в корме способствовало снижению его уровня в гепатопанкреасе у акклимированных мидий, а также росту концентрации эфиров холестерина в жабрах мидий (см. табл. 2). Повышение уровня

лизофосфатидилхолина (ЛФХ) – окисленной формы фосфатидилхолина (ФХ, доминирующий фосфолипид биологических мембран), а также снижение концентрации фосфатидилинозитола (ФИ) отмечалось в гепатопанкреасе мидий в ходе их акклимации к лабораторным условиям (см. табл. 2). Важно подчеркнуть, что содержание мембранных липидов (фосфолипидов и холестерина), а также жирнокислотный

состав фосфолипидов жабр не подвергались значительным изменениям в процессе акклимации моллюсков к новым лабораторным условиям. Вероятно, у двустворчатых моллюсков, жабры которых в первую очередь подвергаются воздействию внешних факторов среды обитания, присутствует система регуляции гомеостаза липидного и жирнокислотного состава мембран с включением в них ПНЖК из внутренних резервов организма [Soudant et al., 1998; Pernet et al., 2008]. Так, пониженное содержание некоторых ПНЖК n-3 и n-6 семейств в составе искусственного корма в значительной степени отразилось на жирнокислотном составе триацилглицеринов жабр, а также фосфолипидов и триацилглицеринов гепатопанкреаса. Низкий уровень полиеновых жирных кислот, главным образом n-3 ПНЖК (эйкозапентаеновой 20:5n-3 и докозагексаеновой 22:6n-3 кислот), и некоторых n-6 ПНЖК в составе триацилглицеринов жабр и гепатопанкреаса у акклимированных моллюсков (см. табл. 3), вероятно, свидетельствует об использовании данных жирных кислот в качестве собственного внутреннего резерва для поддержания необходимого уровня ненасыщенности мембранных фосфолипидов жабр и гепатопанкреаса. В отличие от жабр, в составе фосфолипидов гепатопанкреаса отмечались значительные перестройки на уровне жирнокислотного состава. Несмотря на накопление короткоцепочечных насыщенных жирных кислот 12:0 и 14:0, в составе фосфолипидов гепатопанкреаса наблюдалось снижение концентрации НЖК за счет длинноцепочечных представителей – 16:0, 18:0, 20:0, 22:0 и 24:0 и общее повышение уровня ненасыщенности (см. табл. 3) благодаря повышенному содержанию n-3 полиеновых кислот (рост соотношения n-3/n-6 за счет снижения уровня n-6 ПНЖК), моноеновых 16:1n-7 и 18:1n-7 кислот, а также метилэтиленразделенных жирных кислот (НМРЖК). Вероятно, у акклимированных моллюсков в условиях недостаточного поступления эссенциальных фитопланктонных n-3 ПНЖК в гепатопанкреасе активируется дополнительный синтез НМРЖК [Zhukova, 1991], который возможен также благодаря высоким концентрациям их метаболитических предшественников – моноеновых 16:1n-7 и 18:1n-7 кислот. Известно, что НМРЖК в составе фосфолипидов мембран, так же как и полиеновые кислоты обычного строения, участвуют в поддержании жидкостности липидного бислоя, которая, как известно, обеспечивает работу мембранно-связанных ферментов, ионных каналов и рецепторов [Barnathan, 2009].

Заключение

Исследование модификаций липидного и жирнокислотного спектра мидий *M. edulis* Белого моря в результате акклимации их к лабораторным условиям с использованием искусственного корма в качестве источника пищи показало, что состав различных классов липидов и их жирных кислот, главным образом гепатопанкреаса моллюсков, зависит от состава пищи. Установленные модификации состава липидов гепатопанкреаса у акклимированных моллюсков преимущественно на уровне жирнокислотного спектра энергетической (триацилглицерины) липидной фракции вызваны, по-видимому, недостатком эссенциальных фитопланктонных ПНЖК n-3 семейства в исследуемом корме. Кроме того, показано, что состав мембранных липидов и их жирных кислот жабр практически не зависит от источника пищи, тогда как жирнокислотный спектр триацилглицеринов достаточно точно отражает спектр трофических жирных кислот.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Беломорской биологической станции «Картеш» ЗИН РАН за возможность проводить исследования на станции, а также лично заведующему станцией к. б. н. А. А. Сухотину за предоставленные пробы сестона.

Финансовое обеспечение работ осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0221-2014-0003, гранта Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ 1642.2012.4 и НШ-1410.2014.4.

Литература

- Озернюк Н. Д. Феноменология и механизмы адаптационных процессов. М.: МГУ, 2003. 215 с.
- Сидоров В. С., Лизенко Е. И., Болгова О. М., Нефедова З. А. Липиды рыб. 1. Методы анализа // Лососевые (Salmonidae) Карелии. Экология. Паразитофауна. Биохимия. Петрозаводск: КФАН СССР, 1972. Вып. 1. С. 150–163.
- Цыганов Э. П. Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагелем // Лабор. дело. 1971. № 8. С. 490–493.
- Alkanani T., Parrish C. C., Thompson R. J., McKenzie C. H. Role of fatty acids in cultured mussels, *Mytilus edulis*, grown in Notre Dame Bay, Newfoundland // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2007. Vol. 348. P. 33–45. doi: 10.1016/j.jembe.2007.02.017
- Arduini A., Peschechera A., Dottori S. et al. High performance liquid chromatography of long-chain acylcar-

nitine and phospholipids in fatty acid turnover studies // *Journal of Lipid Research*. 1996. Vol. 37. P. 684–689.

Barnathan G. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: occurrence, characterization, and biological properties // *Biochimie*. 2009. Vol. 91 (6). P. 671–678. doi: 10.1016/j.biochi.2009.03.020.

Bayne B. Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* during starvation // *Netherlands Journal of Sea Research*. 1973. Vol. 7. P. 399–410. doi: 10.1016/0077-7579(73)90061-6.

Engelbrecht F. M., Mari F., Anderson J. T. Cholesterol. Determination in Serum. A Rapid Direction Method // *S. A. Med. J.* 1974. Vol. 48 (7). P. 250–256.

Fokina N. N., Ruokolainen T. R., Bakhmet I. N., Nemova N. N. Lipid composition in response to temperature changes in blue mussels *Mytilus edulis* L. from the White Sea // *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2015. Vol. 95 (08). P. 1629–1634. doi: 10.1017/S0025315415000326.

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

Freites L., Fernandez-Reiriz M. J., Labarta U. Fatty acid profiles of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) mussel of subtidal and rocky shore origin // *Comp. Biochem. Physiol. B*. 2002. No 2. P. 453–461. doi: 10.1016/S1096-4959(02)00057-X.

Hochachka P. M., Somero G. N. *Biochemical Adaptation*. Oxford: Princeton University Press, 2002. 478 p.

Khardin A. S., Aizdaicher N. A., Latyshev N. A. Changes in the fatty acid composition of hepatopancreas of the mollusk *Mytilus trossulus* fed on microalgae // *Russian Journal of Marine Biology*. 2003. Vol. 29 (6). P. 378–382. doi: 10.1023/B:RUMB.0000011706.89867.ec.

Nogueira L., Garcia D., Trevisan R. et al. Biochemical responses in mussels *Perna perna* exposed to diesel B5 // *Chemosphere*. 2015. Vol. 134. P. 210–216. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.04.034.

Pernet F., Tremblay R., Redjah I. et al. Physiological and biochemical traits correlate with differences in growth rate and temperature adaptation among groups of the eastern oyster *Crassostrea virginica* // *J. Exp. Biol.* 2008. Vol. 211 (6). P. 969–77.

Petterson A. K., Turchini G. M., Jahangard S. et al. Effects of different dietary microalgae on survival, growth, settlement and fatty acid composition of

blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) larvae // *Aquaculture*. 2010. Vol. 309 (1). P. 115–124. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.09.024.

Soudant P., Marty Y., Moal J. et al. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.) // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 1998. Vol. 121 (3). P. 279–288. doi: 10.1016/S1095-6433(98)10130-7.

Thompson R. J., Ratcliffe N. A., Bayne B. L. Effects of starvation on structure and function in the digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.) // *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1974. Vol. 54 (03). P. 699–712. http://dx.doi.org/10.1017/S0025315400022864.

Trevisan R., Arl M., Sacchet C. L. et al. Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity // *Aquatic toxicology*. 2012. Vol. 108. P. 85–93. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.09.023.

Trevisan R., Mello D. F., Uliano-Silva M. et al. The biological importance of glutathione peroxidase and peroxidoreductase backup systems in bivalves during peroxide exposure // *Marine environmental research*. 2014. Vol. 101. P. 81–90. doi: 10.1016/j.marenvres.2014.09.004.

Viarengo A., Canesi L. Mussels as biological indicators of pollution // *Aquaculture*. 1991. Vol. 94 (2). P. 225–243. http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(91)90120-V.

Viso A. C., Marty J. C. Fatty acids from 28 marine microalgae // *Phytochemistry*. 1993. Vol. 34, No 6. P. 1521–1533. doi: 10.1016/S0031-9422(00)90839-2.

Widdows J., Donkin P. Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects // Gosling E. (ed). *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, 1992. P. 383–424.

Zhukova N. V. The pathway of the biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in mollusks // *Comp. Biochem. Physiol. B*. 1991. Vol. 100. P. 801–804. doi: 10.1016/0305-0491(91)90293-M.

Zhukova N. V., Imbs A. B., Fa Yi L. Diet-induced changes in lipid and fatty acid composition of *Artemia salina* // *Comp. Biochem. Physiol. B*. 1998. Vol. 120. P. 499–506. doi: 10.1016/S0305-0491(98)10036-6.

Поступила в редакцию 10.09.2015

References

Cyganov Je. P. Metod prjamogo metilirovanija lipidov posle TSH bez jeljuirovanija s silikagelem [Method for direct methylation of lipids after TLC without elution with silica gel]. *Labor. Delo [Lab. Science]*. 1971. No 8. P. 490–493.

Ozernyuk N. D. Fenomenologiya i mekhanizmy adaptacionnyh processov [Phenomenology and adaptation mechanisms]. Moscow: MGU, 2003. 215 p.

Sidorov V. S., Lizenko E. I., Bolgova O. M., Nefedova Z. A. Lipidy ryb. 1. Metody analiza [Fish lipids. 1. Methods of analysis]. Lososevye (Salmonidae) Karelii. Jekologija. Parazitofauna. Biohimija [...]. Petrozavodsk: KFAN SSSR. 1972. Iss.1. P. 150–163.

Alkanani T., Parrish C. C., Thompson R. J., McKenzie C. H. Role of fatty acids in cultured mussels, *Mytilus edulis*, grown in Notre Dame Bay, Newfoundland. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2007. Vol. 348. P. 33–45. doi: 10.1016/j.jembe.2007.02.017

Arduini A., Peschechera A., Dottori S., Sciarroni A. F., Serafini F., Calvani M. High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies. *Journal of Lipid Research*. 1996. Vol. 37. P. 684–689.

Barnathan G. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: occurrence, characterization,

and biological properties. *Biochimie*. 2009. Vol. 91 (6). P. 671–678. doi: 10.1016/j.biochi.2009.03.020.

Bayne B. Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* during starvation. *Netherlands Journal of Sea Research*. 1973. Vol. 7. P. 399–410. doi: 10.1016/0077-7579(73)90061-6.

Engelbrecht F. M., Mari F., Anderson J. T. Cholesterol. Determination in Serum. A Rapid Direction Method. *S. A. Med. J.* 1974. Vol. 48 (7). P. 250–256.

Fokina N. N., Ruokolainen T. R., Bakhmet I. N., Nemova N. N. Lipid composition in response to temperature changes in blue mussels *Mytilus edulis* L. from the White Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2015. Vol. 95 (08). P. 1629–1634. doi: 10.1017/S0025315415000326.

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

Freites L., Fernandez-Reiriz M. J., Labarta U. Fatty acid profiles of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) mussel of subtidal and rocky shore origin. *comp. Biochem. Physiol. B*. 2002. No 2. P. 453–461. doi: 10.1016/S1096-4959(02)00057-X.

Hochachka P. M., Somero G. N. *Biochemical Adaptation*. Oxford: Princeton University Press, 2002. 478 p.

Khardin A. S., Aizdaicher N. A., Latyshev N. A. Changes in the fatty acid composition of hepatopáncreas of the mollusk *Mytilus trossulus* fed on microalgae. *Russian Journal of Marine Biology*. 2003. Vol. 29 (6). P. 378–382. doi: 10.1023/B: RUMB.0000011706.89867.ec.

Nogueira L., Garcia D., Trevisan R., Sanches A. L. M., da Silva Acosta D., Dafre, A. L., ... de Almeida E. A. Biochemical responses in mussels *Perna perna* exposed to diesel B5. *Chemosphere*. 2015. Vol. 134. P. 210–216. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.04.034.

Pernet F., Tremblay R., Redjah I., Sévigny J. M., Gionet C. Physiological and biochemical traits correlate with differences in growth rate and temperature adaptation among groups of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Exp. Biol.* 2008. Vol. 211 (6). P. 969–77.

Pettersen A. K., Turchini G. M., Jahangard S., Ingram B. A., Sherman, C. D. Effects of different dietary microalgae on survival, growth, settlement and fatty acid composition of blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) larvae. *Aquaculture*. 2010. Vol. 309 (1). P. 115–124. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.09.024.

Soudant P., Marty Y., Moal J., Masski H., François Samain J. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). *comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 1998. Vol. 121 (3). P. 279–288. doi: 10.1016/S1095-6433(98)10130-7.

Thompson R. J., Ratcliffe N. A., Bayne B. L. Effects of starvation on structure and function in the digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1974. Vol. 54 (03). P. 699–712. <http://dx.doi.org/10.1017/S0025315400022864>.

Trevisan R., Arl M., Sacchet C. L., Engel C. S., Danielli N. M., Mello D. F., ... Dafre A. L. Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. *Aquatic toxicology*. 2012. Vol. 108. P. 85–93. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.09.023.

Trevisan R., Mello D. F., Uliano-Silva M., Delapetra G., Arl M., Dafre A. L. The biological importance of glutathione peroxidase and peroxiredoxin backup systems in bivalves during peroxide exposure. *Marine environmental research*. 2014. Vol. 101. P. 81–90. doi: 10.1016/j.marenvres.2014.09.004.

Viarengo A., Canesi L. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*. 1991. Vol. 94 (2). P. 225–243. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90120-V](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(91)90120-V).

Viso A. C., Marty J. C. Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry*. 1993. Vol. 34, No 6. P. 1521–1533. doi: 10.1016/S0031-9422(00)90839-2.

Widdows J., Donkin P. Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: Gosling E. (ed). *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and aquaculture*. Elsevier. Amsterdam, 1992. P. 383–424.

Zhukova N. V. The pathway of the biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in mollusks. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 1991. Vol. 100. P. 801–804. doi: 10.1016/0305-0491(91)90293-M.

Zhukova N. V., Imbs A. B., Fa Yi L. Diet-induced changes in lipid and fatty acid composition of *Artemia salina*. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 1998. Vol. 120. P. 499–506. doi: 10.1016/S0305-0491(98)10036-6.

Received September 10, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Фокина Наталья Николаевна

старший научный сотрудник, 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

CONTRIBUTORS:

Fokina, Natalia

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

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) 571879

Бахмет Игорь Николаевич

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

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) 571879

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
tel.: (8142) 571879

УДК 577.1.574.24

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ (КАТЕПСИНОВ В И D) В МЫШЦАХ МОЛОДИ (0+, 1+, 2+) АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ ИЗ РЕКИ ВАРЗУГА

Н. Н. Немова, М. Ю. Крупнова, Д. А. Ефремов, А. Е. Веселов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В статье представлены результаты экспериментальных исследований по изменению активности лизосомальных протеиназ в мышцах молоди атлантического лосося на ранних стадиях онтогенеза. Исследованы основные протеолитические ферменты лизосом (катепсины В и D), которые являются важнейшими участниками лизосомально-аутофагической системы клетки и различаются по химизму катализа, рН оптимуму, субстратной специфичности, отношению к ингибиторам, функциональной активности. Показана сравнительно высокая активность основной эндопротеиназы лизосом аспартатного типа – катепсина D в раннем развитии лосося (сеголетки 0+), что указывает на ведущую роль именно этого фермента в полной деградации белка, необходимого для обеспечения аминокислотами и пептидами для поддержания гомеостаза организма молоди в период, когда завершается экзогенное питание и начинается переход на смешанное питание. Активность цистеинзависимой протеиназы лизосом – катепсина В в мышцах рыб возрастает по мере «взросления» молоди лосося от сеголеток до пестряток, что указывает на интенсификацию протеолиза, связанную с ускорением темпов роста по мере развития молоди. Разнонаправленное изменение активности основных протеиназ лизосом (повышение активности катепсина В и снижение активности катепсина D) в мышцах атлантического лосося разных возрастов (0+, 1+, 2+) указывает на специфичный характер участия этих гидролаз во внутриклеточном протеолизе у молоди исследуемых рыб.

Ключевые слова: экологическая биохимия; атлантический лосось; рост и развитие; лизосомы; катепсины.

N. N. Nemova, M. Yu. Krupnova, D. A. Efremov, A. E. Veselov. THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEASES (CATHEPSINS B AND D) IN THE MUSCLES OF JUVENILE (0+, 1+, 2+) ATLANTIC SALMON FROM THE VARZUGA RIVER

The results of experimental studies on changes in lysosomal protease activity in muscles of Atlantic salmon early in the ontogeny are presented. The main lysosomal proteolytic enzymes (cathepsins B and D) participating in lysosomal autophagy and differing in the catalysis chemistry, pH optimum, substrate specificity, response to inhibitors, functional activity were investigated. A relatively high activity of the main lysosomal aspartate type endoproteinase (cathepsin D) at the early stage of salmon development (0+) was shown. It points to the leading role of this enzyme in complete protein degradation required to supply amino acids and peptides to maintain the homeostasis in juveniles as they move on to the mixed feeding mode. The activity of the lysosomal cystein type proteinase

(cathepsin B) in muscles increases as the development of salmon progresses from stage 0+ (fingerlings) to stage 2+ (parr). This fact indicates intensification of proteolysis due to increasing growth rates. Multidirectional changes in the activity of the main lysosomal proteases (increase in the activity of cathepsin B and decrease in the activity of cathepsin D) in the muscles of Atlantic salmon of ages 0+, 1+, 2+ indicates that the involvement of these hydrolases in the intracellular proteolysis in juvenile salmon is stage-specific.

Key words: environmental biochemistry; Atlantic salmon; growth and development; lysosomes; cathepsins.

Введение

Одна из важнейших сигнальных и метаболических ферментных систем клетки – внутриклеточный протеолиз, который находится под гормональным контролем и регулирует метаболизм на всех стадиях развития организма [Дин, 1980; Лысенко и др., 2011]. Известно, что скорость роста рыбы, ее двигательная активность и обеспеченность энергетическими субстратами детерминированы интенсивностью расщепления белка в скелетных мышцах, составляющих до 75 % живого веса рыбы [Mommsen, 2001, 2004; Ling et al., 2011]. Регуляция скорости деградации белка может значительно изменить скорость роста и накопления белковой массы, поэтому характеристика протеолитических механизмов очень важна для понимания ростовых процессов. Непосредственными регуляторами деградации белков мышечной ткани рыб служат лизосомально-аутофагическая (с участием катепсинов) и кальпаиновая протеолитические системы [Mommsen, 2004; Salem et al., 2006; Seilliez, 2012, 2014]. У рыб обнаружены более десяти катепсинов, относящихся к химически различным типам катализа, из них основную роль во внутриклеточном протеолизе играют катепсины В (цистеиновая протеиназа) и D (аспартатная протеиназа) [Mommsen, 2004; Лысенко и др., 2011]. Кислый pH-оптимум (3,0–4,0 для катепсина D; 4,8–5,0 для катепсина В), субстратная специфичность, данные ингибиторного анализа свидетельствуют о значительном сходстве ферментов рыб с одноименными лизосомальными ферментами из более высокоорганизованных организмов. У лососевых рыб, по оценкам Seilliez с соавторами [Seilliez et al., 2014], аутофагическая деградация составляет 30–34 %, а оставшаяся доля приходится на кальцийзависимый протеолиз, протеасому и малоизученные протеиназы цитозоля.

В данной работе изучалась динамика активности основных лизосомальных протеиназ (катепсинов В и D) в мышцах атлантического лосося из реки Варзуга (Собачий порог) у молоди разных возрастных групп (0+, 1+ и 2+).

Материалы и методы

Молодь лосося (*Salmo salar* L.) разных возрастных групп (0+, 1+ и 2+) отлавливали в осенний сезон (октябрь 2014 г.) в Собачьем пороге главного русла приполярной реки Варзуга (бассейн Белого моря), расположенном на удалении в 24,6 км от устья (рис. 1). Протяженность порога составляет около 600 м, ширина изменяется в пределах 120–160 м. Собачий порог, как и большинство порогов этой реки, мелководный. На нем ежегодно происходит нерест производителей атлантического лосося и обитает молодь разных возрастных групп: 0+, 1+, 2+, 3+. После вторичного перераспределения мальки лосося (сеголетки 0+) занимают летние микростации, активно питаются и ведут типичный для пестряток лосося оседлый образ жизни (в диапазоне температур 13–19 °С). Плотность молоди всех возрастов варьирует в пределах 22–54 экз./100 м² (0,7 экз./м²). Осенью при снижении обилия дрифта пестрятки переходят на частичное питание донными организмами с грунта и прикрепленными к водной растительности личинками ручейников и моллюсков, доминирующих в это время года в составе бентоса [Шустов и др., 2012]. К осени размер мальков составляет 3,8–4,3 см. В последующие годы происходит рост молоди лосося в три летних периода (1+ – 5,1–6,8 см, 2+ – 8,8–10,1 см, 3+ – 11,5–15,7 см) и зимовки в состоянии низкой активности. В конце четвертого зимнего периода пестрятки смолтифицируются и мигрируют на нагул из реки в море. Размер смолтов 12,0–17,5 см.

Для вылова рыб применяли аппарат электролова (Fa-1) норвежского производства. После отлова мальков выдерживали в течение суток в русловых садках для снятия эффекта воздействия электрического поля [Нефедова и др., 2014].

Экспериментальные работы выполнены с использованием оборудования ЦКП ИО Института биологии КарНЦ РАН.

В мышцах молоди атлантического лосося возраста 0+, 1+, 2+ изучали активность



Рис. 1. Спутниковая фотография Собачьего порога (из Google earth). Стрелками обозначено направление стрежня потока воды

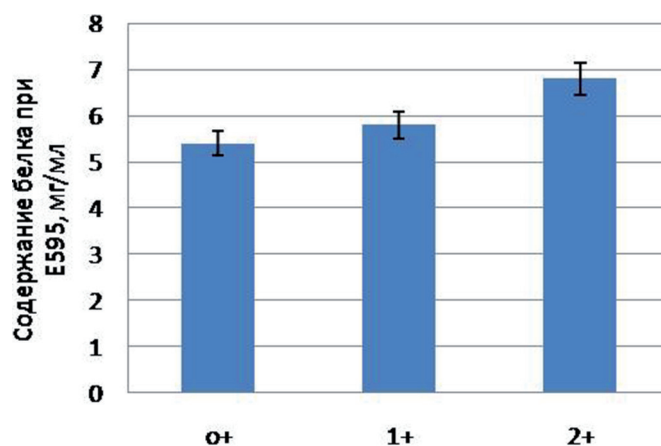


Рис. 2. Содержание белка в скелетных мышцах молоди (0+, 1+, 2+) лосося из р. Варзуга (Собачий порог), $p \leq 0,05$

кислых протеиназ лизосом – катепсинов В (ЕС 3.4.22.1) и D (ЕС 3.4.23.5). Показатели оценивали индивидуально ($n = 5-7$).

Количественное содержание белка в тканях (мг/мл) определяли по методу Брэдфорд [Bradford, 1976], применяя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Активность лизосомальных протеиназ. После гомогенизации образцов тканей в соотношении 1 : 10 в растворе 0,25 М сахарозы с добавлением 0,01 % Тритона X-100 (1200 об./мин, 60 с) и их центрифугирования (10000 г, 30 мин, K-24, Германия) в супернатанте определяли спектрофотометрически активность катепсина В (КФ 3.4.22.1) по расщеплению 0,065 М этилового эфира гидрохлорида N-бензоил L-аргинина в 0,1 М ацетатном буфере (pH 5,0) [Matsuda, Misaka, 1974] и катепсина D (КФ 3.4.23.5)

по гидролизу 1%-го бычьего гемоглобина в 0,1 М ацетатном буфере (pH 3,6) согласно модифицированному методу Ансона [Anson, 1938; Barrett, Heath, 1977; Дин, 1980]. Активность катепсинов В и D (ед. акт.) выражали в единицах изменения оптического поглощения (E_{525} и E_{280} соответственно) на 1 мг белка за 1 ч инкубации (37 °C).

Статистическая обработка результатов. Достоверность различий оценивалась с использованием непараметрического критерия Уилкоксона–Манна–Уитни ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Различия в содержании белка в скелетных мышцах молоди лосося разных возрастов незначительные (рис. 2).

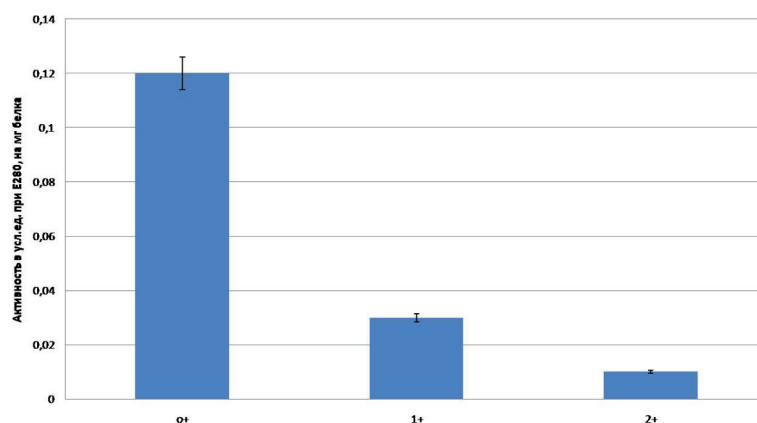


Рис. 3. Активность катепсина D в скелетных мышцах молоди (0+, 1+, 2+) лосося из р. Варзуга (Собачий порог), $p \leq 0,05$

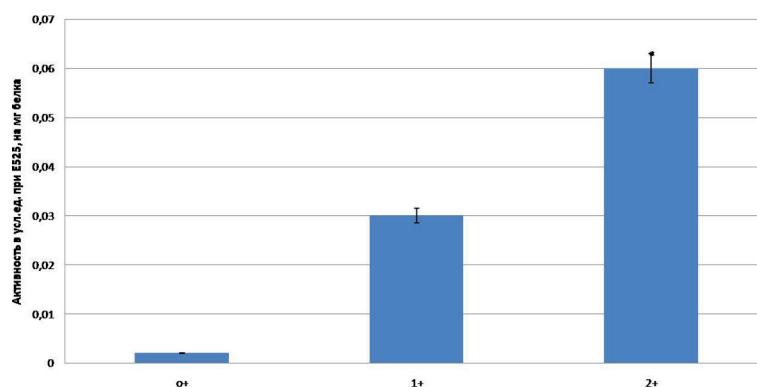


Рис. 4. Активность катепсина B в мышцах молоди (0+, 1+, 2+) лосося из р. Варзуга (Собачий порог), $p \leq 0,05$

Активность аспаратной протеиназы лизосом – катепсина D в скелетных мышцах молоди лосося возраста 1+ и 2+ (пестрятки) достоверно снижена по сравнению с сеголетками (0+) в 3–5 раз (рис. 3). При этом активность цистеиновой протеиназы лизосом – катепсина B повышается в 3–5 раз в процессе развития молоди лосося от сеголеток (0+) до пестряток (2+) (рис. 4).

На ранних этапах развития (сеголетки 0+), когда молодь первого года жизни адаптируется к внешней среде обитания, для ее активного роста и дальнейшего развития лосося очень важен интенсивный протеолиз [Bohley, 1987; Лысенко и др., 2011]. Сравнительно высокая активность основной эндопротеиназы лизосом – катепсина D у сеголеток на данном этапе развития свидетельствует о ведущей роли именно этого фермента в полной деградации белка, необходимого для обеспечения аминокислотами и пептидами ранних сеголеток, у которых через три месяца после выклева завершается переход на экзогенное питание (от стадии личинки к стадии малька). Известно, что основная функция катепсина D заключается в полном протеолизе белковых молекул

до дипептидов и аминокислот [Bohley, 1987], но не в регуляторных реакциях ограниченного протеолиза.

При этом активность катепсина B возрастает по мере развития молоди лосося от стадии 0+ (сеголетки) до стадии 2+ (пестрятки). Сравнительно более высокая активность катепсина B у годовиков молоди лосося (2+) может указывать на интенсификацию лизосомального протеолиза с участием цистеиновых протеиназ в связи с усилением темпов роста молоди. Известно [Дин, 1980; Bohley, 1987], что функция катепсина B связана не только с участием в реакциях полной деградации белковой молекулы, но также показана его роль в регуляторных реакциях, связанных с ограниченным протеолизом во множестве физиологических процессов, особенно каскадных. Можно полагать, что высокая активность катепсина B у молоди лосося более старших возрастов отражает ведущую роль этой протеиназы (наряду с кальцийзависимыми цистеиновыми протеиназами) в процессах роста и развития. Не исключено, что на эти процессы может также оказывать влияние и изменение качественного состава пищи в рационе лососей, так как известно, что

двухлетки в возрасте 1+ начинают питаться более крупными беспозвоночными, что приводит к различиям в составе пищи, наблюдаемым между сеголетками (0+) и пестрятками (возраста 1+ и старше) [Шустов, 1983].

Разнонаправленный характер изменения активности исследуемых катепсинов у молоди разных возрастов может отражать их независимую генетическую регуляцию в онтогенезе, как это было показано для крыс [Messina et al., 1980]. Ранее в наших исследованиях [Немова, Высоцкая, 2004] при сравнительном изучении активности катепсинов В и D в икре лосося в процессе эмбрионального развития также был показан разнонаправленный характер изменения активности этих катепсинов.

Заключение

Таким образом, в процессе роста и раннего развития атлантического лосося от возраста 1+ до возраста 2+ и 3+ обнаружено разнонаправленное изменение активности основных протеиназ лизосом в мышцах (повышение активности катепсина В и снижение активности катепсина D), что указывает на специфичный характер участия этих гидролаз во внутриклеточном протеолизе у молоди исследуемых рыб.

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

Литература

Дин Р. Процессы распада в клетке. М.: Мир, 1980. 120 с.

Лысенко Л. А., Немова Н. Н., Канцерова Н. П. Протеолитическая регуляция биологических процессов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 480 с.

Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 216 с.

Нефедова З. А., Мурзина С. А., Веселов А. Е. и др. Разнокачественность липидных и жирнокислотных спектров у сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* L., различающихся размерно-весовыми характеристиками // Сибирский экологический журнал. 4. 2014. С. 639–645.

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

Шустов Ю. А., Барышев И. А., Белякова Е. Н. Особенности питания молоди атлантического лосося *Salmo salar* L. в субарктической реке Варзуга и ее малых притоках (Кольский полуостров) // Биология внутренних вод. 2012. № 3. С. 66–70.

Anson M. L. The estimation of pepsin, tripsin, papain, and cathepsin with hemoglobin // J. Gen. Physiol. 1938. Vol. 22. P. 79–89.

Barrett A. J., Heath M. Lysosomal enzymes // In: Dingle J. T. (ed.). Lysosomes. A Laboratory handbook, Amsterdam, 1977. P. 19–27.

Bohley P. Intracellular proteolysis // Hydrolytic enzymes. Biomedical division. P. 1987. P. 307–332.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Ling C., Min Z., Li S. Identification and expressional analysis of two cathepsins from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) // Fish & Shellfish Immunology. Vol. 31. Iss. 6. 2011. P. 1270–1277. doi: 10.1016/j.fsi.2011.09.012. Epub 2011 Sep 16.

Matsuda K., Misaka E. Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. I. Purification and multiple forms // J. Biochem. 1974. Sep; 76(3):639–49.

Messina M., Tessitore L., Musi M. et al. Lysosomal hydrolase activities in the developing rat liver // Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1980 Jan 15; 56(1):27–32.

Mommsen T. P. Paradigms of growth in fish // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2001 Jun; 129(2–3):207–19.

Mommsen T. P. Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work // Comp. Biochem. Physiol. B. 2004. Vol. 139(3). P. 383–400.

Salem M., Kenney B., Rexroad C., Yao J. Molecular characterization of muscle atrophy and proteolysis associated with spawning in rainbow trout // Comp. Biochem. Physiol. D. 2006. Vol. 1. P. 227–237. doi: 10.1016/j.cbd.2005.12.003. Epub 2006 Feb 7.

Seilliez I., Gabillard J. C., Riffade M. et al. Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts // Autophagy. 2012. Vol. 136. P. 393–401.

Seilliez I., Dias K., Cleveland B. M. Contribution of the autophagy-lysosomal and ubiquitin-proteasomal proteolytic systems to total proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myotubes // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2014. Vol. 307. P. 1330–1337. doi: 10.1152/ajpregu.00370.2014. Epub 2014 Oct 1.

Поступила в редакцию 10.09.2015

References

Din R. Processy raspada v kletke [Decay processes in cells]. Moscow: Mir, 1980. 120 p.

Lysenko L. A., Nemova N. N., Kancerova N. P. Proteoliticheskaja regulacija biologicheskikh processov

[Proteolytic regulation of biological processes]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2011. 480 p.

Nefedova Z. A., Murzina S. A., Veselov A. E., Ripatti P. O., Nemova N. N. Raznokachestvennost' lipidnykh

i zhirkislotnykh spektrov u segoletok lososya atlanticheskogo lososya *Salmo salar* L., razlichayushchikhsya razmerno-vesovymi kharakteristikami [Heterogeneity of lipids and fatty acids of fingerlings of the Atlantic salmon *Salmo salar* L. different in weight and size]. *Sibirskii ekologicheskii zhurnal* [Contemporary Problems of Ecology]. 4. 2014. P. 639–645.

Nemova N. N., Vysockaja R. U. Biohimicheskaja indikacija sostojanija ryb [Biochemical indication of fish state]. Moscow: Nauka, 2004. 216 p.

Shuster Ju. A. Jekologija molodi atlanticheskogo lososja [Ecology of juvenile Atlantic salmon]. Petrozavodsk: Karelija, 1983. 152 p.

Shustov Ju. A., Baryshev I. A., Beljakova E. N. Osobennosti pitanija molodi atlanticheskogo lososja *Salmo salar* L. v subarkticheskoi reke Varzuga i ejo malyh pritokakh (Kol'skij poluoostrov) [Juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) feeding in the subarctic River Varzuga and its small tributaries (Kola Peninsula)]. *Biologija vnutrennih vod* [Inland water biology]. 2012. No 3. P. 66–70.

Anson M. L. The estimation of pepsin, tripsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 1938. Vol. 22. P. 79–89.

Barrett A. J., Heath M. Lysosomal enzymes. In: Dingle J. T. (ed.). *Lysosomes. A Laboratory handbook*, Amsterdam, 1977. P. 19–27.

Bohley P. Intracellular proteolysis. *Hydrolytic enzymes. Biomedical division*. P. 1987. P. 307–332.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Ling C., Min Z., Li S. Identification and expression analysis of two cathepsins from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish & Shellfish*

Immunology. Vol. 31, iss. 6. 2011. P. 1270–1277. doi: 10.1016/j.fsi.2011.09.012. Epub 2011 Sep 16.

Matsuda K., Misaka E. Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. I. Purification and multiple forms. *J. Biochem.* 1974 Sep; 76(3):639–49.

Messina M., Tessitore L., Musi M., Baccino F. M., Fiszer-Szafarz B., Nadal C. Lysosomal hydrolase activities in the developing rat liver. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1980 Jan 15; 56(1):27–32.

Mommsen T. P. Paradigms of growth in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2001 Jun; 129 (2–3):207–19.

Mommsen T. P. Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2004. Vol. 139 (3). P. 383–400.

Salem M., Kenney B., Rexroad C., Yao J. Molecular characterization of muscle atrophy and proteolysis associated with spawning in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. D.* 2006. Vol. 1. P. 227–237. doi: 10.1016/j.cbd.2005.12.003. Epub 2006 Feb 7.

Seilliez I., Gabillard J. C., Riffade M., Sadoul B., Dias K., Averous J., Tesseraud S., Skiba S., Panserat S. Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts. *Autophagy*. 2012. Vol. 136. P. 393–401.

Seilliez I., Dias K., Cleveland B. M. Contribution of the autophagy-lysosomal and ubiquitin-proteasomal proteolytic systems to total proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myotubes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014. Vol. 307. P. 1330–1337. doi: 10.1152/ajpregu.00370.2014. Epub 2014 Oct 1.

Received September 10, 2015

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

Крупнова Марина Юрьевна

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: mukrupnova@rambler.ru
тел.: (8142) 571879

Ефремов Денис Александрович

научный сотрудник лаб. экологии рыб и
водных беспозвоночных, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: denisefremov@list.ru
тел.: (8142) 561679

CONTRIBUTORS:

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

Krupnova, Marina

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

Efremov, Denis

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: denisefremov@list.ru
tel.: (8142) 561679

Веселов Алексей Елпидифорович

главный научный сотрудник лаб. экологии рыб и
водных беспозвоночных, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: veselov7771@mail.ru
тел.: (8142) 561679

Veselov, Aleksey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: veselov7771@mail.ru
tel.: (8142) 561679

УДК 577.152.314:597.553.2:591.3

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ НУКЛЕАЗ У МОЛОДИ ЛОСОСЯ *SALMO SALAR* L. РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Е. А. Вдовиченко, Р. У. Высоцкая, Д. А. Ефремов, А. Е. Веселов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

К настоящему времени во всем мире из-за ухудшения экологической обстановки, загрязнения рек промышленными и бытовыми сточными водами, а также нерационального промысла произошло снижение запасов атлантического лосося. На Северо-Западе России одной из немногих рек, где сохранилось естественное воспроизводство этого ценнейшего промыслового вида, является река Варзуга (Мурманская обл.). Для разработки стратегии устойчивого сохранения популяций лосося следует вести мониторинг с целью поддержания стабильных условий обитания в экосистеме реки. Известно, что ферменты, участвующие в белковом, энергетическом и углеводном обмене, являются достаточно информативными показателями процессов роста, развития и адаптации рыб к изменениям окружающей среды. Наряду с вышеперечисленными параметрами для оценки состояния водных экосистем используются лизосомальные гидролазы, в том числе кислые нуклеазы, принимающие участие в компенсаторных перестройках нуклеинового и тесно связанного с ним белкового обмена. В работе исследовалась активность лизосомальных нуклеаз (РНказы, ДНказы) в мышцах атлантического лосося *Salmo salar* L. разных возрастных групп (0+, 1+, 2+) из русла р. Варзуги (Собачий порог). Показано, что активность изученных ферментов и содержание белка в скелетных мышцах рыб линейно увеличивались при переходе от одной возрастной группы к другой и были максимальными у двухгодовиков. Абсолютные значения активности лизосомальной РНказы были несколько выше, чем ДНказы. Полученные данные свидетельствуют об активном участии лизосомальных нуклеаз в адаптивных реакциях молоди лосося в постэмбриональном развитии, что выражается в первую очередь в интенсификации процессов биосинтеза белка. Сделан вывод о том, что условия обитания в р. Варзуге являются благоприятными для роста и развития молоди атлантического лосося.

Ключевые слова: лизосомальные нуклеазы; раннее развитие; лосось *Salmo salar* L.; р. Варзуга.

E. A. Vdovichenko, R. U. Vysotskaya, D. A. Efremov, A. E. Veselov. THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL NUCLEASES IN DIFFERENT AGE GROUPS OF SALMON, *SALMO SALAR* L.

Deterioration of the environment, pollution of rivers by industrial and domestic wastewaters, as well as unsustainable fisheries have caused Atlantic salmon, *Salmo salar* L., stocks to decline all over the world. One of the few rivers in Northwest Russia which has retained the natural reproduction of this highly valuable commercial species is the Varzuga River (Murmansk Region). Monitoring is required to work out the strategy for sustainable conservation of salmon populations, which implies maintenance of stable living condi-

tions in the river ecosystem. Enzymes involved in the protein, energy and carbohydrate metabolism are quite informative indicators of fish growth, development and adaptation to environmental changes. In addition to the parameters mentioned above, the status of aquatic ecosystems is assessed using lysosomal hydrolases, including acid nucleases involved in compensatory transformations of the nucleic metabolism and the closely related protein metabolism. The activity of lysosomal nucleases (RNase, DNase) in muscles in different age groups (0+, 1+, 2+) of juvenile Atlantic salmon from the Varzuga River (Sobachiy rapid) was investigated in the present study. The activity of the enzymes and the protein content in skeletal muscles were shown to increase linearly with age, reaching a maximum in 2-year-old salmon. The absolute values of lysosomal RNase activity were slightly higher than DNase activity. These data indicate that lysosomal nucleases actively participate in early post-embryonic adaptive reactions in juvenile salmon, which appear, first of all, in an intensification of protein biosynthesis. The conclusion was drawn that the living conditions in the Varzuga are favorable for the growth and development of juvenile Atlantic salmon.

Key words: lysosomal nucleases; early stages of development; salmon *Salmo salar* L.; Varzuga River.

Введение

Известно, что формирование популяций рыб является результирующей процессов размножения, роста, полового созревания и смертности [Залепухин, 2008]. Одним из показателей, отражающих значимость эмбрионального и постэмбрионального развития для численности поколений, является разноразнокачественность рыб на ранних этапах онтогенеза [Дехник, 1985]. При изучении популяций рыб в их естественной среде обитания обычно оцениваются темпы роста, увеличение массы и длины, которые демонстрируют степень адаптации к экологическим условиям. На клеточном уровне общую тенденцию адаптивных изменений у молоди рыб отражают такие параметры, как активность ферментов, участвующих в белковом, углеводном и энергетическом обмене. Достаточно информативными являются показатели соотношения РНК/ДНК, уровня экспрессии генов тяжелой цепи миозина и цитохром с оксидазы [Павлов и др., 2007]. Такой биохимический параметр, как активность лизосомальных нуклеаз, может служить дополнительным критерием процессов роста, развития и адаптации рыб к изменяющимся факторам среды обитания, поскольку лизосомы играют важную роль на протяжении всего онтогенеза рыб. Они принимают участие в различных метаболических процессах, связанных с гаметогенезом, оплодотворением, эмбриогенезом, выклевом личинок и их последующим постэмбриональным развитием [Высоцкая, Немова, 2008; Lanes et al., 2009; Биота..., 2012].

Атлантический лосось обитает в морских и пресных водоемах северного полушария в бассейне Атлантического океана и является одним

из ценнейших промысловых видов. В последние годы на севере России ухудшение экологической обстановки и загрязнение водоемов бытовыми и промышленными сточными водами, нерациональный и бесконтрольный вылов привели к значительному спаду объемов вылова лосося в регионе. Считается, что крупнейшая в Европе популяция атлантического лосося, где естественное воспроизводство этого вида еще сохранилось, обитает в р. Варзуга [Калюжин, 2003].

Целью данной работы являлось изучение динамики активности лизосомальных нуклеаз (РНКаза и ДНКаза) в мышцах атлантического лосося из р. Варзуги (Собачий порог) в процессе развития молоди разных возрастных групп.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования была выбрана молодь лосося *Salmo salar* L. разных возрастных групп (0+, 1+, 2+). В каждой группе исследовано от 5 до 7 экземпляров. Пробы отбирали осенью 2014 г. из основного русла р. Варзуга (Собачий порог), относящейся к бассейну Белого моря. Собачий порог является мелководным, со средней глубиной 0,35–0,65 м. Длина порога составляет около 600 м, ширина варьирует в пределах 120–160 м. Скорость течения изменяется в пределах 0,5–1,2 м/с. По гидрохимическим характеристикам вода имеет слабощелочную среду (рН 8,42) и температуру 6,2 °С. Грунт преимущественно валунный с отдельными галечными участками, есть глыбы. На пороге ежегодно происходит нерест производителей атлантического лосося и обитает молодь разных возрастных групп: 0+, 1+, 2+, 3+. Встречаются карликовые самцы в возрасте 4+ и 5+. Плотность

особей всех возрастов варьирует в пределах 22–54 экз./100 м² (0,7 экз./м²). Осенью при снижении обилия дрейфа пестрятки переходят на частичное питание донными организмами с грунта и прикрепленными к водной растительности личинками ручейников и моллюсков, доминирующих в это время года в составе бентоса [Шустов и др., 2012].

Сбор проб осуществляли методом электролова. Затем мальков выдерживали в течение суток в русловых садках для снятия эффекта воздействия электрического поля.

Рыбу доставляли в лабораторию в замороженном состоянии в сосудах Дьюара и хранили при температуре –80 °С. Мышцы для анализа отбирали непосредственно в день определения биохимических показателей. Из навески тканей готовили 10%-е гомогенаты на 0,25 М растворе сахарозы с добавлением 0,001 М раствора ЭДТА и 0,1%-го раствора неионного детергента тритона X-100, затем центрифугировали при 10 000 g и температуре +4 °С в течение 30 мин. В полученном супернатанте определяли активность лизосомальных нуклеаз и содержание белка.

Определение активности 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 0,2 М растворе ацетатного буфера (рН 5,2 и 5,0 соответственно). Принцип методов основан на способности нуклеаз расщеплять соответствующие нуклеиновые кислоты на низкомолекулярные фрагменты, количество которых определяли спектрофотометрически при 260 нм после осаждения нерасщепленных нуклеиновых кислот и их крупных фрагментов 0,5 М раствором хлорной кислоты и 0,25%-м раствором уранилацетата в 0,5 М растворе хлорной кислоты (для ДНК и РНК соответственно). Активность ферментов выражали в условных единицах ΔD_{260} в расчете на 1 мг белка за единицу времени. Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури [Биохимические методы..., 1969].

Полученные данные обработаны статистически с помощью Microsoft Office Excel 2007. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$). Достоверность различий оценивалась по непараметрическому критерию *U* Вилкоксона–Манна–Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$ [Гублер, Генкин, 1969].

Работа выполнена на приборно-аналитической базе центра коллективного пользования научным оборудованием Института биологии КарНЦ РАН.

Результаты

Результаты исследования показали, что активность изученных ферментов существенно зависела от возраста рыб. Так, активность лизосомальной РНКазы в мышцах молоди лосося линейно возрастала при переходе от возрастной группы 0+ к 2+ (рис. 1). Активность кислой ДНКазы в мышцах пестряток (1+ и 2+) также была достоверно выше, чем у сеголеток (0+) (рис. 2). При этом абсолютные значения ДНКазной активности были несколько ниже РНКазной. Содержание белка было практически одинаковым у рыб в возрасте 1+ и 2+ и на 35–48 % ($p < 0,05$) превышало соответствующий показатель у сеголеток (рис. 3).

Обсуждение

Лизосомы обладают широким набором гидролаз, активных при кислых значениях рН и способных осуществлять гидролитическое расщепление практически всех сложных веществ и биополимеров, из которых построена живая материя [Покровский, Тутельян, 1976]. Одними из важнейших макромолекул являются нуклеиновые кислоты, отвечающие за передачу и хранение наследственной информации, а также ее реализацию в ходе процесса трансляции, т. е. биосинтеза белка в организме [Спирин, 2001; Bashan, Yonath, 2008]. Кислые нуклеазы (РНКазы и ДНКазы) участвуют в расщеплении межнуклеотидных фосфодиэфирных связей в молекулах РНК и ДНК [Покровский, Тутельян, 1976; Высоцкая, Немова, 2008; Pizzo et al., 2008].

Результаты исследования показывают, что изменения в активности изученных ферментов носят сходный характер при переходе от сеголеток (0+) к пестряткам (1+, 2+), при этом максимальный уровень ферментативной активности выявлен у двухгодовиков. Следует предположить, что линейно повышающийся уровень активности лизосомальной РНКазы и ДНКазы в мышцах атлантического лосося связан с интенсификацией процессов биосинтеза белка в организме. Это можно подтвердить данными по уровню содержания белка у рыб разных возрастных групп. В более ранних работах по изучению активности лизосомальных ферментов у молоди лосося было установлено, что активность кислой фосфатазы – фермента-маркера лизосом, принимающего участие в липидном и углеводном обмене, а также щелочной фосфатазы – одного из показателей интенсивности роста рыб, возрастали в процессе взросления организма [Высоцкая и др., 2005]. Высокая активность лизосомальной фосфатазы говорит

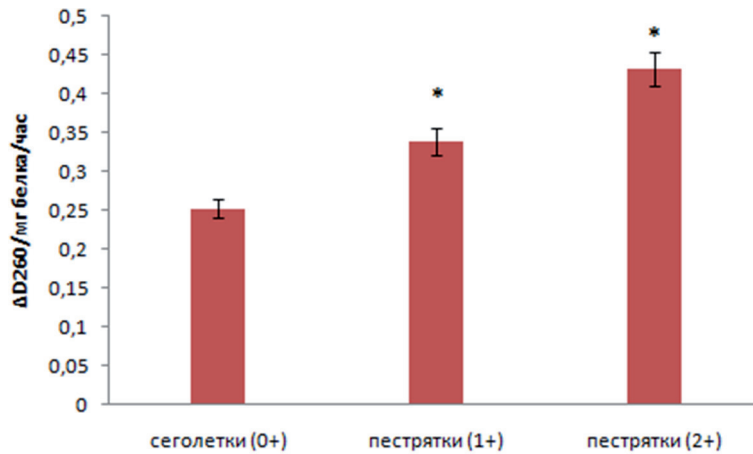


Рис. 1. Активность RNКазы в мышцах молоди лосося из Собачьего порога р. Варзуга. Здесь и далее: *статистически достоверные отличия ($p \leq 0,05$)

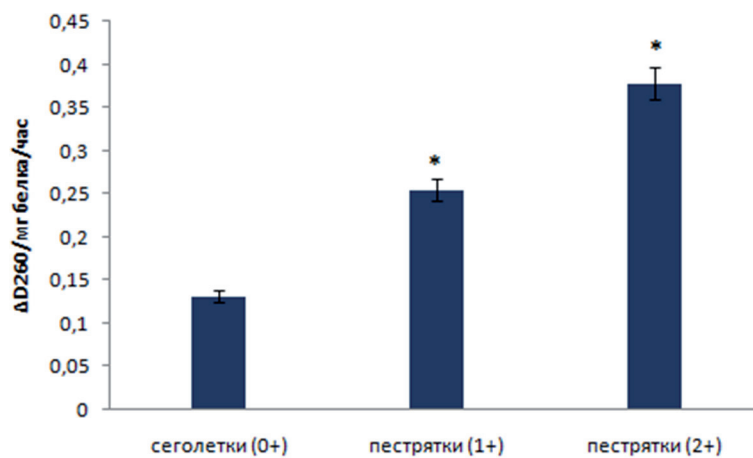


Рис. 2. Активность ДНКазы в мышцах молоди лосося из Собачьего порога р. Варзуга

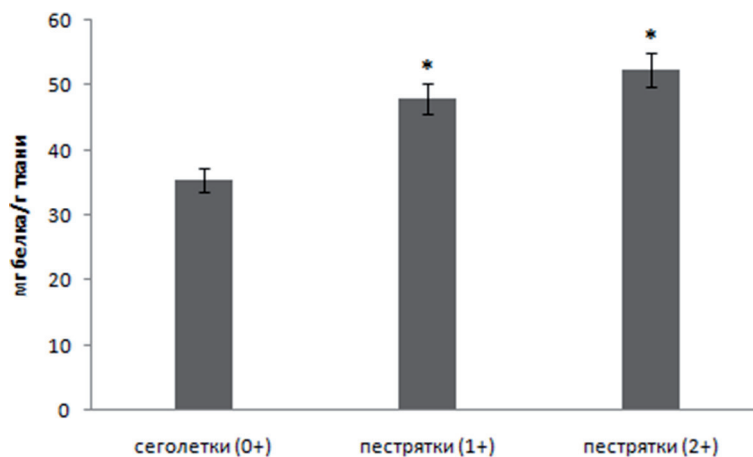


Рис. 3. Содержание белка в мышцах молоди лосося из Собачьего порога р. Варзуга

о большом количестве лизосом, содержащих ферменты, необходимые для расщепления полимерных компонентов в клетке, в том числе нуклеиновых кислот [Немова, Высоцкая, 2004]. Образующиеся продукты гидролиза используются для пластических и энергетических нужд растущего организма, что способствует

успешным перестройкам метаболизма, связанным с переходом мальков от одной стадии развития к другой. Все это указывает на то, что условия обитания молоди лосося (температура воды, скорость течения, кормовая база) способствуют ускоренным темпам роста и развития особей. Стоит отметить, что активность

лизосомальной ДНКазы была несколько ниже, чем РНКазы, что, по всей видимости, обусловлено большей интенсивностью метаболизма РНК и, соответственно, усилением процессов биосинтеза белковых молекул.

Заключение

Таким образом, в результате исследований обнаружено сходное повышение активности лизосомальных нуклеаз (РНКазы и ДНКазы) в мышцах молоди лосося (0+, 1+, 2+), обитающей в р. Варзуга (Собачий порог) в процессе взросления особей. Лизосомальные ферменты, в том числе кислые нуклеазы, осуществляют деградацию выполнивших свои функции биополимеров, тем самым обеспечивая организм компонентами для синтеза новых нуклеиновых кислот, принимающих участие в биосинтезе необходимых на новом этапе развития белковых веществ. Синтезированные белки используются не только для построения структур и тканей молоди рыб, но и выполняют каталитическую и регуляторную функции в организме. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что условия обитания в основном русле р. Варзуги являются благоприятными и способствуют ускоренному темпу роста атлантического лосося.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 14-24-00102 (проект «Лососевые рыбы Северо-Запада России: эколого-биохимические механизмы раннего развития»).

Литература

Биота северных озер в условиях антропогенного воздействия. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2012. 230 с.

Высоцкая Р. У., Ломаева Т. А., Амелина В. С. и др. Активность лизосомальных ферментов у молоди лосося, различающейся выбором участков обитания // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: материалы Международной конференции. Петрозаводск, 2005. С. 32–35.

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

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.

References

Biota severnykh ozer v usloviyakh antropogennogo vozdeystviya [Biota of northern lakes under the anthropogenic pressure]. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2012. 230 p.

Дехник Т. В., Серебряков В. П., Соин С. Г. Значение ранних стадий развития рыб в формировании численности поколений // Теория формирования численности и рационального использования стад промысловых рыб. М.: Наука, 1985. С. 56–72.

Залепухин В. В. Разнокачественность производителей карповых рыб и ее роль в формировании биологических ресурсов // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия Рыбное хозяйство. 2008. № 3. С. 39–42.

Калужин С. М. Атлантический лосось Белого моря: проблемы воспроизводства и эксплуатации. Петрозаводск: ПетроПресс, 2003. 264 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.

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

Павлов Д. С., Мещерякова О. В., Веселов А. Е. и др. Показатели энергетического обмена у молоди атлантического лосося *Salmo salar*, обитающей в главном русле и притоке реки Варзуга (Кольский полуостров) // Вопросы ихтиологии. 2007. Т. 47, № 6. С. 819–826.

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., Тутельян В. А. Лизосомы. М.: Наука, 1976. 351 с.

Спирин А. С. Биосинтез белков, мир РНК и проиххождение жизни // Вестник Российской академии наук. 2001. Т. 71, № 4. С. 320–328.

Шустов Ю. А., Барышев И. А., Белякова Е. Н. Особенности питания молоди атлантического лосося *Salmo salar* L. в субарктической реке Варзуга и ее малых притоках (Кольский полуостров) // Биология внутренних вод. 2012. № 3. С. 66–70.

Bashan A., Yonath A. Correlating ribosome function with high-resolution structures // Trends in Microbiology. Vol. 16, No 7. 2008. P. 326–335. doi: 10.1016/j.tim.2008.05.001.

Lanes C. F. C., Sampaio L. A., Marins L. F. Evaluation of DNase activity in seminal plasma and uptake of exogenous DNA by spermatozoa of the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* // Theriogenology. 71. 2009. P. 525–533. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.08.019.

Pizzo E., Varcamonti M., Maro A. D. et al. Ribonucleases with angiogenic and bactericidal activities from the Atlantic salmon // FEBS Journal. 275. 2008. P. 1283–1295. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06289.x.

Поступила в редакцию 11.09.2015

Dekhnik T. V., Serebryko V. P., Soyn S. G. Znachenie rannikh stadiy razvitiya ryd v formirovanii chislenosti pokoleniy [Role of early stages of fish ontogenesis in formation of the number of generations]. Teoriya

formirovaniya chislenosti i ratsional'nogo ispol'zovaniya stad promyslovykh ryb [Population formation theory and rational use of commercial fish stock]. Moscow: Nauka, 1985. P. 56–72.

Gubler E. V., Genkin A. A. Primenenie kriteriev ne-parametricheskoy statistiki dlya otsenki razlichiy dvukh grupp nablyudeniy v mediki-biologicheskikh issledovaniyakh [Application of criteria of nonparametric statistics for estimating differences between two study groups in biomedical research]. Moscow: Meditsina, 1969. 29 p.

Kalyzhin S. M. Atlanticheskiy losos' Belogo morya: problemy vosproizvodstva i ekspluatatsii [Atlantic salmon in the White Sea basin: problems of reproduction and fisheries]. Petrozavodsk: PetroPress, 2003. 264 p.

Levitskiy A. P., Barabash R. D., Konovets V. M. Sezonnye osobennosti aktivnosti ribonukleazy i α -amilazy slyuny i slyunnykh zhelez u krysa linii Vistar [Seasonal characteristics of ribonuclease and α -amylase activity of saliva and salivary glands in Wistar rats]. Biokhimi-cheskaya evolyutsiya [Biochemical evolution]. Leningrad: Nauka, 1973. P. 192–195.

Nemova N. N., Vysotskaya R. U. Biokhimi-cheskaya indikatsiya sostoyaniya ryb [Biochemical indication of fish state]. Moscow: Nauka, 2004. 215 p.

Pavlov D. S., Meshcheryakova O. V., Veselov A. E., Nemova N. N., Lupandin A. I. Pokazateli energeticheskogo obmena u molodi atlanticheskogo lososya *Salmo salar*, obitayushchey v glavnom rusle i pritoke reki Varzuga (Kol'skiy poluostrov) [Parameters of energy metabolism in juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* living in the mainstream and in the tributary of the Varzuga River (Kola Peninsula)]. *Vopr. Ikht. [J. Ichthyol.]*. 2007. Vol. 47, No 6. P. 819–826.

Pokrovskiy A. A., Archakov A. I. Metody razdeleniya i fermentnoy identifikatsii subkletochnykh fraktsiy [Methods of separation and enzymatic identification of subcellular fractions]. *Sovremennye metody v biokhimii [Modern Methods in Biochemistry]*. Moscow: Meditsina, 1968. P. 5–59.

Pokrovskiy A. A., Tutel'yan V. A. Lizosomy [Lysosomes]. Moscow: Nauka, 1976. 351 p.

Spirin A. S. Biosintez belkov, mir RNK i proiskhozhdenie zhizni [Protein biosynthesis, the RNA world, and

the origin of life]. *Vest. Ros. Akad. Nauk [Herald Russ. Acad. Sci.]*. 2001. Vol. 71, No 4. P. 320–328.

Shustov Yu. A., Baryshev I. A., Belyakova E. N. Osobennosti pitaniya molodi atlanticheskogo lososya *Salmo salar* L. v subarkticheskoy reke Varzuga i ee malykh pritokakh (Kol'skiy poluostrov) [Specific features of the feeding of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L. in the subarctic Varzuga River and its small tributaries (Kola Peninsula)]. *Biol. vnut. vod [Inland Water Biol.]*. 2012. No 3. P. 66–70.

Vysotskaya R. U., Lomaeva T. A., Amelina V. S., Veselov A. E., Morozov D. N. Aktivnost' lizosomal'nykh fermentov u molodi lososya, razlichayushchey v yaborom uchastkov obitaniya [Lysosomal enzymes activity in juvenile salmon living in different areas]. *Sovremennye problemy fiziologii i biokhimii vodnykh organizmov: mat. mezd. konf. (Petrozavodsk, 6–9 sentyabrya 2004)*. Petrozavodsk, 2005. P. 32–35.

Vysotskaya R. U., Nemova N. N. Lizosomy i lizosomal'nye fermenty ryb [Fish lysosomes and lysosomal enzymes]. Moscow: Nauka, 2008. 284 p.

Zalepukhin V. V. Raznokachestvennost' proizvoditeley karpovykh ryb i ee rol' v formirovanii biologicheskikh resursov [The heterogeneity of carp fish producers and its role in the formation of biological resources]. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta [Vestnik of Astrakhan State Technical University]*. 2008. No 3. P. 39–42.

Bashan A., Yonath A. Correlating ribosome function with high-resolution structures // *Trends in Microbiology*. Vol. 16, No 7. 2008. P. 326–335. doi: 10.1016/j.tim.2008.05.001.

Lanes C. F. C., Sampaio L. A., Marins L. F. Evaluation of DNase activity in seminal plasma and uptake of exogenous DNA by spermatozoa of the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Theriogenology*. 71. 2009. P. 525–533. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.08.019.

Pizzo E., Varcamonti M., Maro A. D., Zanfardino A., Giancola C., D'Alessio G. Ribonucleases with angiogenic and bactericidal activities from the *Atlantic salmon*. *FEBS Journal*. 275. 2008. P. 1283–1295. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06289.x.

Received September 11, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Вдовиченко Елизавета Андреевна

аспирант, младший научный сотрудник
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: elizaveta.vdovichenko@gmail.com
тел.: (8142) 769810

Восоцкая Римма Ульяновна

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

CONTRIBUTORS:

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

Ефремов Денис Александрович

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

Веселов Алексей Елпидифорович

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

Efremov, Denis

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

Veselov, Alexey

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

УДК 639.3.043.14: 577.115.

ВЛИЯНИЕ КОМБИКОРМОВ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ *PARASALMO MYKISS* (WALBAUM, 1792)

О. Б. Васильева¹, М. А. Назарова², П. О. Рипатти¹, Н. Н. Немова¹

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Вологодский государственный университет

Данная работа была проведена для оценки влияния комбикормов различного состава на темпы роста радужной форели *Parasalmo mykiss* (Walbaum, 1792). В течение восьми месяцев в форелевом хозяйстве, расположенном на Ладожском озере (Республика Карелия, Россия), проводился эксперимент: три группы рыб, не различающихся морфо-генетическими особенностями, возраста 1+ (первоначальная масса рыб 110 г), культивировали на различных комбикормах. Для эксперимента были выбраны три комбикорма, наиболее часто используемые форелеводами Северо-Запада России и различающиеся уровнем белка, структурных липидов и жирных кислот. С марта по ноябрь форель групп № 1 и № 2 выращивали, используя комбикорма № 1 и № 2 соответственно. В конце июня форель группы № 2 случайным образом разделили на две группы, одну из которых – группу № 2 – продолжили кормить комбикормом № 2, а вторую группу – № 3 – перевели на корм другого производителя (комбикорм № 3). В комбикормах было проанализировано содержание общего белка, липидов и жирных кислот. Кроме того, на третьей неделе каждого месяца эксперимента проводили промеры радужной форели (по 50 особей в каждой группе) и ежемесячно оценивали смертность рыб. Установлено, что динамика прироста длины и массы радужной форели зависела от режима кормления рыб. Показаны различия в приросте массы и темпах роста у трех групп рыб. Выявлено, что применение комбикормов с более высоким уровнем структурных компонентов (белок, фосфолипиды и холестерин), а также $\omega 3$ полиненасыщенных жирных кислот (комбикорма № 1 и № 3) способствовало наибольшей активности ростовых процессов у радужной форели (группы № 1 и № 3 соответственно).

Ключевые слова: аквакультура; темп роста; белок; липиды; полиненасыщенные жирные кислоты.

O. B. Vasil`eva, M. A. Nazarova, P. O. Ripatti, N. N. Nemova. EFFECT OF DIFFERENT DIETS ON GROWTH PERFORMANCE IN RAINBOW TROUT, *PARASALMO MYKISS* (WALBAUM, 1792)

The present study aimed to evaluate the effect of different formula feeds on the growth performance in rainbow trout, *Parasalmo mykiss* (Walbaum, 1792). The eight months feeding experiment in a fish farm in Lake Ladoga (Republic of Karelia, Russia) was conducted to investigate the effects of different diets on the growth rate in three genetically similar and homogeneous groups of juvenile rainbow trout aged 1+ (initial body weight 110 g). Three commercial formula feeds often used in fish farms in Northwest Russia and with different levels of protein, structural lipids and fatty acids were used. From March to

November groups 1 and 2 were fed commercial diets 1 and 2, respectively. Late in June group 2 was randomly divided into two subgroups (groups 2 and 3). Group 2 remained on diet 2, whereas group 3 was fed diet 3 (formula feed by a different manufacturer). The contents of dietary protein, lipids and fatty acids were analyzed in the feeds. In addition, the body weight, body length and mortality of the fish (50 specimens from each group) were measured on the third week of each month of the experiment. The dynamic of linear growth and weight gain in the rainbow trout was found to depend on the fish feeding schedule. Weight gain and growth rate in the three groups of fish were different. Overall, the study established that a diet with a high level of dietary protein, structural lipids (phospholipids, cholesterol) and ω 3 polyunsaturated fatty acids (diets 1 and 3) leads to a higher growth rate in rainbow trout (groups 1 and 3, respectively).

Key words: aquaculture; growth performance; protein; lipids; polyunsaturated fatty acids.

Введение

Решение вопросов рационального использования ресурсов внутренних водоемов относится к числу важнейших актуальных направлений современной биологии, включающих исследования в области ихтиологии, гидробиологии, физиологии, биохимии. Снижение вылова ценных видов рыб из естественных водоемов компенсируется их интенсивным выращиванием в искусственных условиях, в большей степени в морских акваториях [Emre et al., 2007; FAO, 2009]. В то же время наличие большого количества глубоководных озер с чистой водой на северо-западе России позволяет развивать садковое рыбоводство радужной форели в открытых пресных водоемах.

Для реализации основной задачи форелевых хозяйств, связанной с получением товарной продукции за максимально короткий период времени, в качестве источника пищи используют искусственные корма. Численность садковых хозяйств в последнее десятилетие резко возросла, в связи с чем увеличилась потребность в кормах, что привело к резкому дефициту сырья для их производства [FAO, 2008; Hua, Bureau, 2009]. Комбикорма для аквакультуры лососевых рыб производят преимущественно из отходов промыслового рыболовства. Экономически обоснованным альтернативным источником сырья служат продукты растительного происхождения (масла, протеин гороха, глютелин кукурузы и другие), которые, однако, не соответствуют кормовой базе хищных рыб из природных водоемов.

Состав пищи в первую очередь влияет на метаболизм рыб, который определяет интенсивность их роста и развития, а также качество реализуемой форелеводами продукции [Ruyter et al., 2010; Yun et al., 2011]. В настоящее время активно изучается влияние различных составов

комбикормов на морфометрические и физиолого-биохимические характеристики культивируемых рыб, особенно лососевых, однако эти вопросы остаются все еще слабоизученными [Tocher, 2003; Brown et al., 2010]. Целью настоящей работы было определение влияния комбикормов разного состава на темп роста радужной форели *Parasalmo mykiss* (Walbaum, 1792).

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе неполносистемного форелевого хозяйства, расположенного в северной части Ладожского озера (61°42'15" с.ш., 31°0'27" в.д.) (Республика Карелия, Россия). Изучены три группы неполовозрелых самок радужной форели *Parasalmo mykiss* (Walbaum, 1792) в возрасте 1+, не различающихся морфо-генетическими особенностями и культивированных в одинаковых условиях на разных комбикормах. В эксперименте применялись три вида коммерческих комбикормов (с одинаковыми кормовыми коэффициентами), наиболее часто используемые форелеводами Северо-Запада России. Рыб из одного садка, питающихся комбикормом № 1, в марте разделили на две группы (№ 1 и № 2) и культивировали их на комбикормах № 1 и № 2 соответственно. В конце июня форель группы № 2 случайным образом разделили на две группы (№ 2 и № 3), одну из которых – группу № 2 – продолжили кормить комбикормом № 2, а вторую группу – № 3 – перевели на корм другого производителя (комбикорм № 3). Рыб выращивали в близкорасположенных садках с целью нивелирования неконтролируемых факторов. В третьей декаде каждого месяца проводили промеры групп рыб (по 50 особей в каждой группе) и фиксировали пробы кормов на биохимический анализ. В связи с длительным периодом исследования дважды провели смену фракции кормов, при этом

марка комбикорма осталась прежней. С марта по июнь форель кормили кормами фракции А, размер гранул составлял 3 мм в диаметре; 1 июля произошла замена корма на фракцию В (4,5 мм); после 1 сентября рыб кормили комбикормами фракции С (6 мм).

Оценку длины, массы, прироста массы и длины радужной форели, наполненности кишечника, смертности рыб проводили по методике И. Ф. Правдина [1966] с учетом рекомендаций М. В. Мины с соавт. [Мина, Клевезаль, 1976], Л. П. Рыжкова и др. [2000]. В комбикормах определяли общий белок, липиды (структурные и запасные) и жирные кислоты общих липидов. Концентрацию белка оценивали по содержанию азота в пробе, полученного путем сжигания навески корма в колбе Кьельдаля [Филиппович и др., 1975]. Для анализа липидного состава кормов пробы фиксировали смесью Фолча (хлороформ : метанол в соотношении 2 : 1 по объему). Разделение общих липидов проводили методом тонкослойной хроматографии восходящим способом в системе растворителей: петролейный эфир : диэтиловый эфир : уксусная кислота (в соотношении 90 : 10 : 1 по объему) при комнатной температуре [Шталь, 1965]. Концентрацию исследуемых липидных параметров определяли спектрофотометрическими методами [Сидоров и др., 1972; Engelbrecht et al., 1974]. Фракционирование фосфолипидов осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Подвижная фаза (элюент) состояла из смеси растворителей: ацетонитрил : гексан : метанол : фосфорная кислота (918 : 30 : 30 : 17,5 по объему). Обработка хроматограмм проводилась с помощью компьютерной программы «Мультихром-Аналитик, v. 1.5». Для анализа жирнокислотного состава комбикормов выделенные липиды подвергали прямому метилированию [Цыганов, 1971]. Полученные метиловые эфиры жирных кислот разделяли на хроматографе «Кристалл 5000» («Хроматек», Йошкар-Ола). Идентификацию жирных кислот проводили сопоставлением времени выхода пиков экспериментального образца и метчиков, а также путем расчета эквивалента длины цепи и сравнением его с табличными данными [Jamieson, 1975], количественный анализ осуществляли при помощи компьютерной программы «Программа подсчета хроматограмм». Полученные данные обрабатывали общепринятыми статистическими методами [Елисеева, 2007]. Исследования выполнены на научном оборудовании ЦКП НО Института биологии КарНЦ РАН.

Результаты и обсуждение

Интенсивность ростовых процессов радужной форели во многом определяется составом кормов, которые используются при ее выращивании. Для активного роста и развития культивируемых рыб необходим высокий уровень белка в корме, который должен использоваться именно для пластического обмена, а не для энергозатрат организма. Включение в корм соответствующих небелковых источников энергии, таких как липиды, позволяет оптимизировать химический состав кормов, поскольку липиды помимо энергетической выполняют в организме рыб ряд других жизненно важных функций: структурообразующую, регуляторную и прочие, к тому же они служат предшественниками многих биологически активных веществ, в том числе и гормонов [Крепс, 1979; Tocher, 2003].

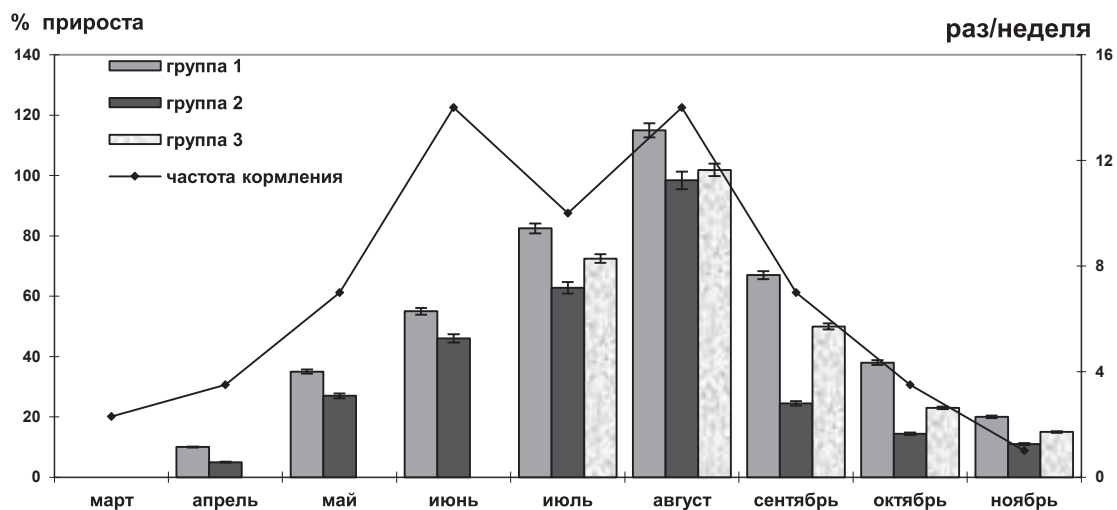
Проведен анализ содержания общего белка и полного липидного состава кормов №№ 1, 2, 3 различных фракций (А, В и С) для аквакультуры радужной форели; полученные результаты представлены в таблице 1. Фракции корма № 1 отличались от соответствующих фракций других исследованных кормов высоким уровнем белка, холестерина, фосфатидилхолина, насыщенных жирных кислот, ω 9 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) (см. табл. 1). Для комбикорма № 2, по сравнению с другими исследованными комбикормами, характерна более высокая концентрация триацилглицеринов (ТАГ), лизофосфатидилхолина, сфингомиелина, ω 6 ПНЖК и низкая – холестерина (ХС) и ω 3 ПНЖК (см. табл. 1). Отличительной особенностью комбикорма № 3 являлось высокое содержание фосфатидилэтаноламина (см. табл. 1).

В данном исследовании установлены различия не только между кормами разных производителей, но и между фракциями одного комбикорма, однако последние были менее выражены (см. табл. 1). Во всех исследованных комбикормах уровень ТАГ увеличился в ряду фракций кормов А-В-С, а концентрация холестерина (ХС), напротив, снижалась (см. табл. 1). При производстве различных фракций кормов учитываются возрастные особенности метаболизма лососевых. У молоди форели активно протекает пластический обмен, поэтому при изготовлении кормов для данной группы рыб используют источники сырья животного происхождения с высоким уровнем структурных компонентов (белок, холестерин, фосфолипиды (ФЛ)). В то время как для возрастных особей характерно накопление липидов в тканях и для

Таблица 1. Содержание белка (% сухой массы), липидных компонентов (% сухой массы) и некоторых жирных кислот общих липидов (% от суммы жирных кислот) в комбикормах

Комбикорм, №	1			2			3	
	A	B	C	A	B	C	B	C
Фракция								
Общий белок	50,4	51,3	49,7	46,4 ^a	42,7 ^{a, d}	40,8 ^{a, e}	43,1	41,3
Общие липиды	19,7	20,2	20,4	22,3 ^a	25,2 ^{a, d}	28,2 ^{a, e}	24,3 ^b	26,3 ^{b, c, e}
Фосфолипиды	4,2	4,1	4,1	4,5	2,3 ^{a, d}	2,7 ^a	4,7 ^{b, c}	4,8 ^{b, c}
Триацилглицерины	12,1	13,2 ^d	13,4	14,7 ^a	19,8 ^{a, d}	22,1 ^{a, e}	15,9 ^{b, c}	17,4 ^{b, c, e}
Эфиры холестерина	0,4	0,5	0,5	1,3 ^a	1,6 ^a	1,8 ^a	1,8 ^{b, c}	2,1 ^{b, c}
Холестерин	2,9	2,5 ^d	2,4	1,8 ^a	1,5 ^{a, d}	1,5 ^a	1,9 ^{b, c}	2,0 ^{b, c}
Фосфатидилэтаноламин	1,5	1,5	1,5	1,1 ^a	0,3 ^{a, d}	0,4 ^{a, e}	2,1 ^{b, c}	2,3 ^{b, c}
Фосфатидилхолин	2,3	2,1	2,1	2,8 ^a	1,5 ^{a, d}	1,8 ^{a, e}	2,1 ^c	2,0
Лизофосфатидилхолин	0,05	0,04	0,05	0,16 ^a	0,15 ^a	0,12 ^a	0,04 ^c	0,04 ^c
Сфингомиелин	0,02	0,02	0,02	0,15 ^a	0,11 ^{a, d}	0,11 ^a	0,05 ^{b, c}	0,06 ^{b, c}
16:0	20,7	20,8	20,9	17,2 ^a	16,0 ^{a, d}	13,7 ^{a, e}	14,3 ^{b, c}	17,5 ^{b, c, e}
Сумма насыщенных кислот	35,9	34,9	35,1	26,1 ^a	25,1 ^a	22,2 ^{a, e}	22,4 ^{b, c}	25,4 ^{b, c, e}
18:1 ω 9	14,9	16,1 ^d	15,5	25,3 ^a	26,6 ^{a, d}	24,5 ^{a, e}	24,4 ^{b, c}	16,6 ^{c, e}
22:1 ω 9	0,9	0,7	0,8	4,2 ^a	6,1 ^{a, d}	6,6 ^a	5,1 ^{b, c}	5,2 ^{b, c}
Сумма мононенасыщенных кислот	31,0	31,3	31,6	42,2 ^a	42,5 ^a	42,2 ^a	45,3 ^{b, a}	39,1 ^{b, c, e}
Сумма ω 9 ПНЖК	0,7	0,7	0,7	0,1 ^a	0,2 ^{a, d}	0,2 ^a	0,3 ^{b, c}	0,3 ^{b, c}
18:2 ω 6	5,2	5,5	5,3	13,0 ^a	16,4 ^{a, d}	19,9 ^{a, e}	8,3 ^{b, c}	8,7 ^{b, c}
20:4 ω 6	1,3	1,2	1,2	0,6 ^a	0,4 ^{a, d}	0,3 ^a	0,4 ^b	0,6 ^{b, c, e}
Сумма ω 6 ПНЖК	9,1	9,1	9,1	15,2 ^a	17,6 ^{a, d}	21,1 ^{a, e}	10,0 ^c	11,6 ^{b, c, e}
18:3 ω 3	1,9	2,1	2,0	3,8 ^a	3,6 ^a	3,3 ^{a, e}	2,9 ^{b, c}	1,6 ^{c, e}
20:5 ω 3	4,0	3,8 ^d	3,9	4,2	4,2	4,0	6,3 ^{b, c}	8,6 ^{b, c, e}
22:6 ω 3	8,6	8,8	8,4	4,9 ^a	4,2 ^{a, d}	4,2 ^a	7,8 ^c	7,6 ^{b, c}
Сумма ω 3 ПНЖК	19,7	19,1	18,5 ^e	15,2 ^a	13,7 ^{a, d}	13,5 ^a	19,6 ^c	21,3 ^{b, c, e}
Сумма полиненасыщенных кислот	33,6	33,8	33,2	31,8	32,3	35,6 ^{a, d}	32,3	35,6 ^{b, e}

Примечание. ^a Различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении кормов 1 и 2 соответствующих фракций; ^b различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении кормов 1 и 3 соответствующих фракций; ^c различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении кормов 2 и 3 соответствующих фракций; ^d различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении фракций А и В одного корма; ^e различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении фракций В и С одного корма.



Прирост массы рыб и режим их кормления в течение эксперимента

них выпускают более калорийные комбикорма, включающие в свой состав растительные масла [Остроумова, 2001; Щербина, Гамыгин, 2006].

Низкий уровень структурных липидов (ФЛ и ХС) в корме № 2 (фракции В и С) по сравнению

с аналогичными фракциями других изученных комбикормов (см. табл. 1) может быть связан с их длительным периодом хранения (более четырех месяцев). Ранее в наших исследованиях было показано [Назарова и др., 2010, 2013;

Таблица 2. Параметры роста радужной форели и смертность рыб

Дата	Группа рыб (n=50), №	Длина рыб, см	Масса рыб, г	Прирост массы рыб	Прирост длины рыб	Отход рыб, шт.
26 марта	1	20,8	110			
	2	21,0	110			
27 апреля	1	21,8	112	1,8	4,8	23
	2	21,1	110 ^a	0,4 ^a	0,5 ^a	31
25 мая	1	23,5	144	28,6	7,8	88
	2	21,6 ^a	140 ^a	27,3	2,4 ^a	94
27 июня	1	25,2	217	50,7	7,2	25
	2	22,5 ^a	205 ^a	46,4 ^a	4,2 ^a	34
27 июля	1	27,1	354	63,1	15,5	86
	2	25,3 ^a	333 ^a	62,4	12,4 ^a	103
	3	27,2 ^c	367 ^c	79,0 ^{b,c}	16,4 ^c	88
24 августа	1	31,1	683	81,2	14,1	22
	2	27,6 ^a	462 ^a	38,7 ^a	9,1 ^a	41
	3	29,6 ^{b,c}	622 ^{b,c}	69,5 ^{b,c}	13,0 ^{b,c}	34
25 сентября	1	34,7	947	60,9	15,3	16
	2	31,8 ^a	649 ^a	40,5 ^a	15,2	65
	3	32,8 ^{b,c}	824 ^{b,c}	32,5 ^{b,c}	10,8 ^{b,c}	22
28 октября	1	36,1	1126	18,9	4,0	13
	2	32,0 ^a	742 ^a	14,3 ^a	0,6 ^a	54
	3	34,2 ^{b,c}	971 ^{b,c}	17,8 ^c	4,3 ^c	24
27 ноября	1	37,9	1436	27,5	4,9	22
	2	32,1 ^a	1098 ^a	48,0 ^a	0,3 ^a	32
	3	34,5 ^{b,c}	1251 ^{bc}	28,8 ^c	0,9 ^{b,c}	29

Примечание. ^a Различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении рыб групп № 1 и № 2; ^b различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении групп рыб № 1 и № 3; ^c различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении групп рыб № 2 и № 3.

Немова и др., 2011], что, несмотря на срок годности продукта, указанный производителями комбикормов, составляющий шесть и более месяцев, уровень общих липидов и их отдельных фракций в кормах уже после четырех месяцев хранения заметно снижался. Содержание триацилглицеринов при хранении значительно не изменялось, сохраняя общую калорийность кормов. Наибольшей деструкции подвергались фосфолипиды комбикормов, что приводит к дефициту данного класса соединений в тканях форели и, как следствие, к снижению темпов роста рыб и ухудшению качества рыбной продукции для потребителя.

Ростовые процессы у гидробионтов зависят от целого комплекса внешних и внутренних факторов, среди которых одним из наиболее значимых является трофический, поскольку состав пищи и степень ее доступности во многом определяет линейно-весовую разнокачественность рыб [Дгебуадзе, 2001]. Трофические цепи гидробионтов формировались в течение длительного периода времени в процессе коэволюции, поэтому кормовая база рыб из природных водоемов имеет оптимальный химический состав для консументов [Pratoomyot et al., 2011]. В условиях аквакультуры форель выращивают на искусственных комбикормах, исходное сырье для производства которых

должно максимально соответствовать естественной пище рыб. Введение в состав корма нехарактерных для натурального питания радужной форели компонентов может оказать значительное воздействие на метаболизм рыб и, как следствие, привести к изменению их физиологического состояния и ростовых процессов [Aslan et al., 1996; Blanchet et al., 2005; Zaman et al., 2008].

Период исследования данной работы охватывал несколько этапов годового цикла рыб – переход от зимовального периода (март–май) к нагульному (июнь–сентябрь) и вновь к зимовке (октябрь–ноябрь). Пищевое поведение рыб определялось сменой режима кормления, включающего в себя частоту подачи корма и его количество, которое было одинаково для всех трех групп форели (рис.). Абсолютное количество корма, вносимого в садки, постепенно увеличивалось с марта по июнь, а в июле, в связи с высокой температурой воды, кормление рыб было снижено (см. рис.).

Динамика прироста массы форели между изученными группами была одинакова и определялась режимом кормления – при переходе с зимовального периода на нагульный темпы прироста массы рыб возрастали, а с сентября – снижались. Однако между группами рыб прирост массы форели различался (см. рис.)

и зависел прежде всего от состава кормов, так как остальные условия культивирования рыб были одинаковыми. Темп роста рыб напрямую зависел от количества белка в корме. Наибольшее содержание общего белка было установлено в корме № 1 (см. табл. 1). Прирост длины и массы рыб, которые культивировались на данном комбикорме, был выше по сравнению с группами рыб № 2 и № 3 (табл. 2; рис.). Однако для активного роста рыб не менее важна и липидная составляющая корма, содержание которой должно быть сбалансировано, поскольку сравнительно высокий уровень липидов приводит к ожирению рыб, а дефицит отрицательно сказывается на их росте и развитии [Carter, 2003; Gümüş, İkiş, 2009]. Оптимальным для лососевых рыб возраста 1+ считается содержание липидов в корме около 20 % сухой массы [Остроумова, 2001]. В кормах № 2 и № 3 уровень общих липидов несколько превышал данное значение (см. табл. 1). Кроме количества липидов в корме важную роль играет и их качественный состав. Наибольшее значение имеет уровень структурных липидов (ФЛ и ХС) в корме, поскольку от их содержания зависит интенсивность пластического обмена. Фосфолипиды и холестерин формируют биомембраны, выполняя не только структурообразующую функцию, но и участвуя в регуляции активности мембраносвязанных ферментов [Ночачка, Somero, 2002]; ХС также служит предшественником стероидных гормонов и других веществ, необходимых для развития организма [Tocher et al., 2008]. Высокий уровень структурных компонентов в кормах № 1 и № 3 (см. табл. 1) способствовал более активному приросту массы рыб соответствующих групп.

На темп роста радужной форели влияет не только уровень ФЛ в корме, но и входящие в состав липидов полиненасыщенные жирные кислоты. ПНЖК играют важную роль в адаптации мембранных структур клеток эктотермных организмов к изменениям условий внешней среды, являются предшественниками биологически активных соединений, таких как эйкозаноиды, и выполняют ряд других важных функций [Ночачка, Somero, 2002; Bell et al., 2006]. В организме радужной форели осуществляется элонгация и десатурация жирных кислот, поэтому ПНЖК могут синтезироваться из незаменимых кислот – линолевой 18:2 ω 6 и линоленовой 18:3 ω 3, содержание которых в исследованных комбикормах соответствовало необходимому, согласно некоторым рекомендациям, уровню [Остроумова, 2001; Blanchard, 2008]. Однако собственный синтез ПНЖК

в организме рыб не восполняет их физиологически необходимое количество [Thanuthong et al., 2011], поэтому для нормального развития радужной форели необходим высокий уровень длинноцепочечных ПНЖК семейства ω 3 (таких как эйкозапентаеновая 20:5 ω 3 и докозагексаеновая 22:6 ω 3 кислоты) в комбикорме, которые способствуют активному росту рыб [Bell et al., 2010]. Соответственно, меньший уровень длинноцепочечных ПНЖК в корме № 2, по сравнению с другими кормами, возможно, определял более низкий темп прироста длины и массы форели соответствующей группы (см. табл. 2). Недостаток поступления ПНЖК в организм рыб может послужить причиной не только снижения ростовых процессов форели, но и нарушения функциональной активности органов и тканей рыб, вплоть до гибели организма [Carter, 2003; Grisdale-Helland et al., 2008].

Одним из индикаторов состояния популяции рыб является показатель их смертности. Большой отход рыб групп № 2 и № 3 по сравнению с группой № 1, возможно, связан с высокой долей эруковой 22:1 ω 9 кислоты в кормах № 2 и № 3 (см. табл. 1 и 2). В настоящее время вопрос о влиянии высокой концентрации эруковой кислоты в комбикорме на метаболизм радужной форели является дискуссионным. По мнению одной группы авторов [Collins et al., 2012; Randall et al., 2013], эруковая кислота не оказывает значимого воздействия на физиолого-биохимические характеристики состояния рыб. Согласно другим литературным источникам [Sahasrabudhe, 1977; Tucker, Hargreaves, 2004], длительное употребление кормов, содержащих более 3 % эруковой кислоты от суммы жирных кислот, может привести к нарушению процессов роста и развития рыб и их гибели. Также на уровень смертности форели, возможно, могло повлиять и повышенное содержание ТАГ в комбикормах № 2 и № 3 (см. табл. 1 и 2), поскольку потребление кормов с высоким уровнем триацилглицеринов (более 20 % сухой массы) приводит к угнетению иммунной системы рыб и их физиологического состояния [Kjær et al., 2009].

Заключение

Комбикорма для лососевых различаются между собой соотношением структурных и запасных веществ, которое зависит от исходного сырья, используемого при производстве корма. В данной работе показано, что доля фосфолипидов, холестерина и полиненасыщенных жирных кислот в комбикормах одного производителя снижается с увеличением крупки корма.

Динамика прироста длины и массы радужной форели зависит от режима кормления рыб. Показаны различия в приросте массы и темпах роста у трех групп рыб за изученный период, которые обусловлены, вероятно, составом комбикормов, на которых они культивировались. Качество кормов определяет темп прироста длины и массы рыб, интенсивность которых зависит от содержания белка, структурных липидов и $\omega 3$ полиненасыщенных жирных кислот в комбикормах.

Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0221-2014-0003, при финансовой поддержке гранта Президента РФ НШ-1410.2014.4 № г. р. 140121103350.

Работа выполнена на базе лаборатории экологической биохимии Института биологии Карельского научного центра РАН.

Литература

- Дгебуадзе Ю. Ю. Экологические закономерности изменчивости роста рыб. М.: Наука, 2001. 276 с.
- Елисеева И. И. Статистика. М.: Высшее образование, 2007. 566 с.
- Крепс Е. М. Клеточные липиды и их роль в адаптации водных организмов к условиям существования // Физиология и биохимия морских и пресноводных животных. Л.: Наука, 1979. С. 3–21.
- Мина М. В., Клевезаль Г. А. Рост животных. М.: Наука, 1976. 291 с.
- Назарова М. А., Васильева О. Б., Руоколайнен Т. Р., Немова Н. Н. Изменение липидных показателей корма для аквакультуры радужной форели в процессе его хранения // Садковое рыбоводство. Состояние и перспективы развития: материалы международной конференции (11–13 октября 2010 г.). Петрозаводск: ПетрГУ, 2010. С. 47–50.
- Назарова М. А., Васильева О. Б., Немова Н. Н. Оценка состава кормов для аквакультуры с целью рационального использования водных ресурсов // Молодые исследователи – регионам: материалы международной научной конференции. В 2-х т. Вологда: ВоГТУ, 2013. Т. 1. С. 444–445.
- Немова Н. Н., Васильева О. Б., Руоколайнен Т. Р., Назарова М. А. Оценка липидных показателей комбикормов для аквакультуры радужной форели в процессе хранения // Кормопроизводство. 2011. № 3. С. 44–47.
- Остроумова И. Н. Биологические основы кормления рыб. СПб.: ГосНИОРХ, 2001. 372 с.
- Правдин И. Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищевая пром-ть, 1966. 96 с.
- Рыжков Л. П., Кучко Т. Ю., Кучко Я. А. Выращивание форели в садках. Петрозаводск: ПетрГУ, 2000. 56 с.
- Сидоров В. С., Лизенко Е. И., Болгова О. М., Нефедова 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.
- Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1975. 318 с.
- Цыганов Э. П. Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагеля // Лабораторное дело. 1971. № 8. С. 490–493.
- Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. М.: Мир, 1965. 508 с.
- Щербина М. А., Гамыгин Е. А. Кормление рыб в пресноводной аквакультуре. М.: ВНИРО, 2006. 360 с.
- Aslan S. S., Guven K. C., Gezgin T. et al. Comparison of fatty acid contents of wild and cultured rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* in Turkey // Food Chemistry. 1996. Vol. 57, No 3. P. 359–363. doi: 10.1111/j.1444-2906.2007.01452.x.
- Bell J. G., Strachan F., Good J. E., Tocher D. R. Effect of dietary echium oil on growth, fatty acid composition and metabolism, gill prostaglandin production and macrophage activity in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) // Aquacult. Res. 2006. Vol. 37. P. 606–617. doi: 10.1111/j.1365-2109.2006.01470.x.
- Bell J. G., Pratoomyot J., Strachan F. et al. Growth, flesh adiposity and fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) families with contrasting flesh adiposity: Effects of replacement of dietary fish oil with vegetable oils // Aquaculture. 2010. No 306. P. 225–232. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.05.021.
- Blanchet C., Lucas M., Julien P. et al. Fatty acid composition of wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Lipids. 2005. Vol. 40, No 5. P. 529–531. doi: 10.1007/s11745-005-1414-0.
- Blanchard G., Makombu J. G., Kestemont P. Influence of different dietary 18:3n-3/18:2n-6 ratio on growth performance, fatty acid composition and hepatic ultrastructure in Eurasian perch, *Perca fluviatilis* // Aquaculture. 2008. Vol. 284, No 1–4. P. 144–150. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.07.011.
- Brown T. D., Francis D. S., Turchini G. M. Can dietary lipid source circadian alternation improve omega-3 deposition in rainbow trout? // Aquaculture. 2010. Vol. 300, No 1–4. P. 148–155. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.12.020.
- Carter C. G. Aquaculture: nutrition for growth and product quality // Asia Pac. J. Clin. Nutr. 2003. No 12. P. 115–122.
- Collins S. A., Desai A. R., Mansfield G. S. et al. The effect of increasing inclusion rates of soybean, pea and canola meals and their protein concentrates on the growth of rainbow trout: Concepts in diet formulation and experimental design for ingredient evaluation // Aquaculture. 2012. Vol. 344–349. P. 90–99. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.02.018.
- Emre Y., Okumus I., Maltas O. Trout farming. Marine aquaculture in Turkey // Turkish Marine Reserch Foundation. Istanbul Turkey. 2007. P. 21–26.

Engelbrecht F. M., Mari F., Anderson J. T. Cholesterol determination in serum. A rapid direction method // *Med. J.* 1974. Vol. 48, No 7. P. 250–356.

FAO Fisheries and aquaculture information and statistics service. Aquaculture production 1950–2006. FiSHSTAT plus-universal software for fishery statistical time series [online or CD-ROM]. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2008. 122 p.

FAO The state of world fisheries and aquaculture, 2008. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 2009. 96 p.

Grisdale-Helland B., Shearer K. D., Gatlin D. M., Helland S. J. Effects of dietary protein and lipid levels on growth, protein digestibility, feed utilization and body composition of Atlantic cod (*Gadus morhua*) // *Aquaculture*. 2008. Vol. 283, No 1–4. P. 156–162. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.07.013.

Gümüş E., İköz R. Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth performance, chemical contents and digestibility in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 // *Pakistan Vet. J.* 2009. Vol. 29. P. 59–63.

Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution. New York: Oxford University Press, 2002. 466 p.

Hua K., Bureau D. P. Development of a model to estimate digestible lipid content of salmonid fish feeds // *Aquaculture*. 2009. Vol. 286, No 3–4. P. 180–184. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.09.028.

Jamieson G. R. GLS-identification techniques for longchain unsaturated fatty acids // *J. Chromatogr. Sci.* 1975. Vol. 13, No 10. P. 491–497.

Kjær M. A., Vegusdal A., Berge G. M. et al. Characterisation of lipid transport in Atlantic cod (*Gadus morhua*) when fasted and fed high or low fat diets // *Aquaculture*. 2009. Vol. 288, No 3–4. P. 325–336. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.12.022.

Pratoomyot J., Bendiksen E. A., Campbell P. J. et al. Effects of different blends of alternative protein sources as alternatives to dietary fishmeal on growth performance

and body lipid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // *Aquaculture*. 2011. Vol. 316, No 1–4. P. 44–52. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.03.007.

Randall K. M., Reaney M. J. T., Drew M. D. Effect of dietary coriander oil and vegetable oil sources on fillet fatty acid composition of rainbow trout // *Canadian Journal of Animal Science*. 2013. Vol. 93. P. 345–352.

Ruyter B., Røjø C., Grisdale-Helland B. et al. Influence of temperature and high dietary linoleic acid content on esterification, elongation, and desaturation of PUFA in atlantic salmon hepatocytes // *Lipids*. 2010. Vol. 38, No 8. P. 833–840.

Sahasrabudhe M. R. Crismer values and erucic acid contents of rapeseed oils // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1977. Vol. 54, No 8. P. 320–324.

Thanuthong T., Francis D. S., Manickam E. et al. Fish oil replacement in rainbow trout diets and total dietary PUFA content: II) Effects on fatty acid metabolism and in vivo fatty acid bioconversion // *Aquaculture*. 2011. Vol. 322–323. P. 99–108.

Tocher D. R. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish // *Reviews in Fisheries Science*. 2003. Vol. 11, No 2. P. 107–184.

Tocher D. R., Bendiksen E. Å., Campbell P. J., Bell J. G. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish // *Aquaculture*. 2008. Vol. 280. P. 21–34.

Tucker C. S., Hargreaves J. A. Biology and culture of channel catfish / C. S. 369 Tucker: Elsiver, 2004. 634 p.

Yun B., Mai K., Zhang W., Xu W. Effects of dietary cholesterol on growth performance, feed intake and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed high plant protein diets // *Aquaculture*. 2011. Vol. 319, No 1–2. P. 105–110.

Zaman M. U., Sarker S. R., Hossain S. The effects of industrial effluent discharge on lipid peroxide levels of punti fish *Puntius sophore* tissue in comparison with those of freshwater fish // *Journal of Food Lipids*. 2008. Vol. 15, No 2. P. 198–208.

Поступила в редакцию 15.09.2015

References

Dgebuadze Yu. Yu. Ekologicheskie zakonomernosti izmenchivosti rosta ryb. [Environmental regularities of variability in fish growth patterns]. Moscow: Nauka, 2001. 276 p.

Eliseeva I. I. Statistika [Statistic]. Moscow: Vysshee obrazovanie, 2007. 566 p.

Filippovich Yu. B., Egorova T. A., Sevast'yanova G. A. Praktikum po obshchei biokhimi [Practical guide on general biochemistry]. Moscow: Prosveshchenie, 1975. 318 p.

Kreps E. M. Kletochnye lipidy i ikh rol' v adaptatsii vodnykh organizmov k usloviyam sushchestvovaniya [Cellular lipids and their role in the adaptation of aquatic organisms to living conditions]. Fiziologiya i biokhimiya morskikh i presnovodnykh zhivotnykh [Physiology and biochemistry of marine and freshwater animals]. Leningrad: Nauka, 1979. P. 3–21.

Mina M. V., Klevezal' G. A. Rost zhivotnykh [Animal growth]. Moscow: Nauka, 1976. 291 p.

Nazarova M. A., Vasil'eva O. B., Ruokolainen T. R., Nemova N. N. Izmenenie lipidnykh pokazatelei korma dlya akvakul'tury raduzhnoi foreli v protsesse ego khraneniya [Changes in lipid parameters of feed for aquaculture of rainbow trout during storage]. Sadkovoe rybovodstvo. Sostoyanie i perspektivy razvitiya: materialy mezhdunarodnoi konferentsii (11–13 oktyabrya 2010 g.) [Cage culture fishery. Status and development prospects. Proc. of intern. conf. (October 11–13, 2010)]. Petrozavodsk: PetrGU, 2010. P. 47–50.

Nazarova M. A., Vasil'eva O. B., Nemova N. N. Otsenka sostava kormov dlya akvakul'tury s tsel'yu ratsional'nogo ispol'zovaniya vodnykh resursov [Estimation of aquaculture feed composition for rational use of water resources]. Molodye issledovateli – regionam:

materialy mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii [Young researchers – to regions. Proc. intern. sci. conf.]. In 2 vols. Vologda: VoGTU, 2013. Vol. 1. P. 444–445.

Nemova N. N., Vasil'eva O. B., Ruokolainen T. R., Nazarova M. A. Otsenka lipidnykh pokazatelei kombikormov dlya akvakul'tury raduzhnoi foreli v protsesse khraneniya [Assessment of lipid parameters of feed for aquaculture of rainbow trout during storage]. Kormoproizvodstvo [Forage production]. 2011. No 3. P. 44–47.

Ostroumova I. N. Biologicheskie osnovy kormleniya ryb [Biological basis of fish feeding]. St. Petersburg: GosNIORH, 2001. 372 p.

Pravdin I. F. Rukovodstvo po izucheniyu ryb [Fish Study Guide]. Moscow: Pishchevaya prom-t', 1966. 96 p.

Ryzhkov L. P., Kuchko T. Yu., Kuchko Ya. A. Vyrashchivanie foreli v sadkakh [Cultivation of trout in cages]. Petrozavodsk: PetrGU, 2000. 56 p.

Sidorov V. S., Lizenko E. I., Bolgova O. M., Nefedova Z. A. Lipidy ryb. 1. Metody analiza. Tkanevaya spetsifichnost' ryapushki *Coregonus albula* L. [Lipids of fish. 1. Methods of analysis. Tissue specificity of lipids in whitefish *Coregonus albula* L.]. Lososevye (Salmonidae) Karelii [Salmons (Salmonidae) in Karelia]. Petrozavodsk: Karel. fil. AN SSSR, 1972. Vol. 1. P. 152–163.

Shtal' E. Khromatografiya v tonkikh sloyakh [Thin-layer chromatography]. Moscow: Mir, 1965. 508 p.

Shcherbina M. A., Gamygin E. A. Kormlenie ryb v presnovodnoi akvakul'ture [Fish feeding in freshwater aquaculture]. Moscow: VNIRO, 2006. 360 p.

Tsyganov E. P. Metod pryamogo metilirovaniya lipidov posle TSKh bez elyuirovaniya s silikagelya [Method for direct methylation of lipids after TLC without elution with silica gel]. Laboratornoe delo [Laboratory science]. 1971. No 8. P. 490–493.

Aslan S. S., Guven K. C., Gezgin T., Alpaslan M., Tekinay A. Comparison of fatty acid contents of wild and cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Turkey. *Food Chemistry*. 1996. Vol. 57, No 3. P. 359–363. doi: 10.1111/j.1444-2906.2007.01452.x.

Bell J. G., Pratoomyot J., Strachan F., HENDERSON R. J., Fontanillas R., Hebard A., Guy D. R. Growth, flesh adiposity and fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) families with contrasting flesh adiposity: Effects of replacement of dietary fish oil with vegetable oils. *Aquaculture*. 2010. No 306. P. 225–232. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.05.021.

Bell J. G., Strachan F., Good J. E., Tocher D. R. Effect of dietary echium oil on growth, fatty acid composition and metabolism, gill prostaglandin production and macrophage activity in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquacult. Res.* 2006. Vol. 37. P. 606–617. doi: 10.1111/j.1365-2109.2006.01470.x.

Blanchard G., Makombu J. G., Kestemont P. Influence of different dietary 18:3n-3/18:2n-6 ratio on growth performance, fatty acid composition and hepatic ultrastructure in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquaculture*. 2008. Vol. 284, No 1–4. P. 144–150. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.07.011.

Blanchet C., Lucas M., Julien P., Morin R., Gin-gras S., Dewailly E. Fatty acid composition of wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids*. 2005. Vol. 40, No 5. P. 529–531. doi: 10.1007/s11745-005-1414-0.

Brown T. D., Francis D. S., Turchini G. M. Can dietary lipid source circadian alternation improve omega-3 deposition in rainbow trout? *Aquaculture*. 2010. Vol. 300, No 1–4. P. 148–155. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.12.020.

Carter C. G. Aquaculture: nutrition for growth and product quality. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2003. No 12. P. 115–122.

Collins S. A., Desai A. R., Mansfield G. S., Hill J. E., Van Kessel A. G., Drew M. D. The effect of increasing inclusion rates of soybean, pea and canola meals and their protein concentrates on the growth of rainbow trout: Concepts in diet formulation and experimental design for ingredient evaluation. *Aquaculture*. 2012. Vol. 344–349. P. 90–99. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.02.018.

Emre Y., Okumus I., Maltas O. Trout farming. Marine aquaculture in Turkey. *Turkish Marine Reserch Foundation*. Istanbul Turkey. 2007. P. 21–26.

Engelbrecht F. M., Mari F., Anderson J. T. Cholesterol determination in serum. A rapid direction method. *Med. J.* 1974. Vol. 48, No 7. P. 250–356.

FAO Fisheries and aquaculture information and statistics service. Aquaculture production 1950–2006. FISHSTAT plus-universal software for fishery statistical time series [online or CD-ROM]. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2008. 122 p.

FAO The state of world fisheries and aquaculture, 2008. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 2009. 96 p.

Grisdale-Helland B., Shearer K. D., Gatlin D. M., Helland S. J. Effects of dietary protein and lipid levels on growth, protein digestibility, feed utilization and body composition of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*. 2008. Vol. 283, No 1–4. P. 156–162. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.07.013.

Gümüş E., İköz R. Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth performance, chemical contents and digestibility in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792. *Pakistan Vet. J.* 2009. Vol. 29. P. 59–63.

Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution. New York: Oxford University Press. 2002. 466 p.

Hua K., Bureau D. P. Development of a model to estimate digestible lipid content of salmonid fish feeds. *Aquaculture*. 2009. Vol. 286, No 3–4. P. 180–184. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.09.028.

Jamieson G. R. GLS-identification techniques for longchain unsaturated fatty acids. *J. Chromatogr. Sci.* 1975. Vol. 13, No 10. P. 491–497.

Kjær M. A., Vegusdal A., Berge G. M., Galloway T. F., Hillestad M., Krogdahl Å., Holm H., Ruyter B. Characterisation of lipid transport in Atlantic cod (*Gadus morhua*) when fasted and fed high or low fat diets. *Aquaculture*. 2009. Vol. 288, No 3–4. P. 325–336. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.12.022.

Pratoomyot J., Bendiksen E. A., Campbell P. J., Jauncey K. J., Bell J. G., Tocher D. R. Effects of different blends of alternative protein sources as alternatives to dietary fishmeal on growth performance and body lipid

composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 2011. Vol. 316, No 1–4. P. 44–52. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.03.007.

Randall K. M., Reaney M. J. T., Drew M. D. Effect of dietary coriander oil and vegetable oil sources on fillet fatty acid composition of rainbow trout. *Canadian Journal of Animal Science*. 2013. Vol. 93. P. 345–352.

Ruyter B., Røjø C., Grisdale-Helland B., Rosenlund G., Obach A., Thomassen M. S. Influence of temperature and high dietary linoleic acid content on esterification, elongation, and desaturation of PUFA in atlantic salmon hepatocytes. *Lipids*. 2010. Vol. 38, No 8. P. 833–840.

Sahasrabudhe M. R. Crismer values and erucic acid contents of rapeseed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1977. Vol. 54, No 8. P. 320–324.

Thanuthong T., Francis D. S., Manickam E., Senadheera S. D., Cameron-Smith D., Turchini G. M. Fish oil replacement in rainbow trout diets and total dietary PUFA content: II) Effects on fatty acid metabolism and in vivo fatty acid bioconversion. *Aquaculture*. 2011. Vol. 322–323. P. 99–108.

Tocher D. R. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*. 2003. Vol. 11, No 2. P. 107–184.

Tocher D. R., Bendiksen E. Å., Campbell P. J., Bell J. G. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*. 2008. Vol. 280. P. 21–34.

Tucker C. S., Hargreaves J. A. Biology and culture of channel catfish / C. S. 369 Tucker: Elsilver, 2004. 634 p.

Yun B., Mai K., Zhang W., Xu W. Effects of dietary cholesterol on growth performance, feed intake and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed high plant protein diets. *Aquaculture*. 2011. Vol. 319, No 1–2. P. 105–110.

Zaman M. U., Sarker S. R., Hossain S. The effects of industrial effluent discharge on lipid peroxide levels of punti fish *Puntius sophore* tissue in comparison with those of freshwater fish. *Journal of Food Lipids*. 2008. Vol. 15, No 2. P. 198–208.

Received September 15, 2015

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Васильева Ольга Борисовна

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

Назарова Марина Александровна

старший преподаватель кафедры химии ПИ
Вологодский государственный университет
ул. Ленина, 15, Вологда, Россия, 160035
эл. почта: marinamarina35@yandex.ru
тел.: (8172) 725201

Рипатти Паули Онниевич

ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биохимии, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

Немова Нина Николаевна

директор, член-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) 769810

CONTRIBUTORS:

Vasil'eva, 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

Nazarova, Marina

Vologda State University
15 Lenin St., 160035 Vologda, Russia
e-mail: marinamarina35@yandex.ru
tel.: (8172) 725201

Ripatti, Pauli

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

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

УДК 577.125.8

СОСТАВ ЛИПИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ, ИМЕЮЩИХ РАЗНЫЕ ГЕНОТИПЫ ПО -308G>A ПОЛИМОРФНОМУ МАРКЕРУ ГЕНА *TNF*

Л. В. Топчиева¹, И. В. Курбатова¹, И. Е. Малышева¹,
В. А. Корнева², О. Ю. Барышева², О. П. Дуданова²

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Петрозаводский государственный университет

Исследовано влияние замены гуанина на аденин в -308 позиции промотора гена *TNF* на состав липидов у здоровых и больных эссенциальной артериальной гипертензией (ЭАГ), ревматоидным артритом (РА) и неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ) доноров. Показано повышение уровня фактора некроза опухоли (TNF α) в плазме крови у больных людей по сравнению с донорами из контрольной группы, которое сопровождалось изменением содержания триглицеридов, холестерина липопротеинов высокой и низкой плотности у больных эссенциальной артериальной гипертензией и неалкогольным стеатогепатитом. Выявлено влияние генотипа по полиморфному маркеру -308G>A гена *TNF* на уровень общего холестерина в плазме крови у больных НАСГ и на содержание холестерина липопротеинов высокой плотности у пациентов с ЭАГ. В контрольной группе и у пациентов с РА не обнаружено достоверных отличий уровня липидов у носителей разных генотипов по изучаемому маркеру. Результаты исследования свидетельствуют о влиянии -308G>A полиморфизма гена *TNF* на состав липидов плазмы крови, однако не позволяют четко говорить о том, какая именно аллель обладает проатерогенными свойствами.

Ключевые слова: фактор некроза опухоли альфа; полиморфизм гена; состав липидов; эссенциальная артериальная гипертензия; ревматоидный артрит; неалкогольный стеатогепатит.

L. V. Topchieva, I. V. Kurbatova, I. E. Malysheva, V. A. Korneva, O. Yu. Barysheva, O. P. Dudanova. THE LIPID PROFILE IN HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH DIFFERENT GENOTYPES OF THE -308G>A POLYMORPHIC MARKER OF THE *TNF* GENE

The effect of the substitution of guanine with adenine at position -308 in the *TNF* gene promoter on the lipid profile in healthy donors and patients with essential hypertension (EH), rheumatoid arthritis (RA) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) was studied. A rise of the tumor necrosis factor (TNF α) level in the blood plasma of patients as compared to donors from the control group was shown. It was accompanied by a change in the levels of triglycerides, high-density and low-density lipoprotein cholesterol in the blood plasma of patients with essential hypertension and non-alcoholic steatohepatitis. The effect of the genotype of the polymorphic marker -308G>A of the *TNF* gene on the level of total cholesterol in the blood plasma of patients with NASH and on the level of

high-density lipoprotein cholesterol in patients with EH was revealed. No significant differences in lipid levels in the blood plasma of carriers of different genotypes of the studied markers in the control group and in patients with RA were found. The findings suggest that the -308G>A polymorphism of the *TNF* gene affects the lipid profile of blood plasma, but do not clearly indicate which specific allele has the pro-atherogenic properties.

Key words: tumor necrosis factor alpha; gene polymorphism; lipid composition; essential hypertension; rheumatoid arthritis; non-alcoholic steatohepatitis.

Введение

Известно, что при ряде полигенных заболеваний, например эссенциальной артериальной гипертензии, ревматоидном артрите и неинфекционных заболеваниях печени, наблюдается изменение баланса про- и противовоспалительных цитокинов [Bautista et al., 2005; Braunersreuther et al., 2012]. Уровень провоспалительных белков, таких как фактор некроза опухоли альфа (TNF α), интерлейкин 6 (IL6), С-реактивный белок, в крови больных людей, как правило, повышен, тогда как концентрация противовоспалительных белков, например интерлейкина 10 (IL10), напротив, снижена [Kugelman et al., 2003; Bautista et al., 2005; Brennan, McInnes, 2008], что свидетельствует о наличии хронического воспаления при этих патологиях. По данным литературы, увеличение содержания TNF α в плазме может сопровождаться изменением липидного профиля как у здоровых доноров, так и у пациентов с разными диагнозами [Sheu et al., 2000; Skoog et al., 2002; Paik et al., 2013]. Причем обнаружена положительная корреляция между уровнем этого цитокина в плазме крови с содержанием атерогенных фракций липидов, например, холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) и их окисленных форм [Ito et al., 2001; Paik et al., 2013]. Снижение содержания холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) и повышение концентрации в плазме ХС-ЛПНП и триглицеридов (ТГ) способствует развитию гиперлипидемии, являющейся важным фактором риска развития атеросклероза. Вероятно, поэтому при ряде заболеваний, сопровождающихся локальным или хроническим воспалением, повышен риск развития кардиоваскулярных патологий. Например, у пациентов, страдающих ревматоидным артритом, неинфекционными заболеваниями печени, наблюдается ряд сердечно-сосудистых расстройств, в том числе и повышение артериального давления [Новикова и др. 2011; Fargion et al., 2014]. Применение ими лекарственных препаратов, ингибиторов TNF α способствует нормализации уровня систолического и диастолического давления крови [Yoshida et al., 2014].

Продукция TNF α в организме определяется рядом факторов, в том числе наличием одонуклеотидных замен в регуляторной области кодирующего его гена [Wilson et al., 1997]. Наиболее изучено влияние замены гуанина на аденин в -308 позиции промотора гена *TNF* на его экспрессию и содержание белка. Рядом авторов отмечено повышение транскрипционной активности гена *TNF* у носителей аллеля А, сопровождаемое увеличением содержания цитокина в плазме крови [Fernandes et al., 2002]. В то же время имеются работы, в которых не выявлена связь уровня транскриптов гена *TNF* и содержания белка с генотипами по изучаемому маркеру как у здоровых, так и больных людей [Mekinian et al., 2011]. Некоторые авторы высказывают предположение о связи указанного полиморфизма гена *TNF* с риском развития атерогенной дислипидемии и атеросклероза [Ройтберг и др., 2011]. Тем не менее литературные данные относительно влияния указанной мутации в гене *TNF* на состав липидов весьма противоречивы [Hermann et al., 1998; Gander, 2004; Jeanmonod et al., 2004; Sookoian et al., 2005]. Так, у французов, имеющих в генотипе аллель А, отмечено повышение в плазме крови содержания триглицеридов и общего холестерина [Hermann et al., 1998]. В других исследованиях не обнаружено отличий в составе липидов у носителей разных генотипов по -308G>А полиморфному маркеру изучаемого гена [Gander, 2004; Jeanmonod et al., 2004; Sookoian et al., 2005; Aller et al., 2010]. Следовательно, вопрос о том, влияет ли полиморфизм гена *TNF* на состав липидов, остается открытым.

Цель исследования – изучить состав липидов в плазме крови у здоровых и больных ЭАГ (I-II стадии), ревматоидным артритом и неалкогольным стеатогепатитом доноров, имеющих разные генотипы по -308G>А полиморфному маркеру гена *TNF*.

Материалы и методы

Для анализа использовано 75 образцов цельной крови доноров контрольной группы, 113 образцов цельной крови пациентов с ЭАГ,

68 – пациентов с неалкогольным стеногепатитом (НАСГ) и 34 – пациентов с ревматоидным артритом (РА). Средний возраст доноров контрольной группы составил $37,38 \pm 1,43$ года; пациентов с ЭАГ – $48,31 \pm 1,66$ года, пациентов с НАСГ – $47,75 \pm 1,50$ года; пациентов с РА – $58,35 \pm 1,69$ года. Диагноз ЭАГ был установлен впервые врачами ГБУЗ «Больница скорой медицинской помощи» г. Петрозаводска с учетом клинических рекомендаций Всероссийского научного общества кардиологов [Диагностика..., 2010]. Диагноз НАСГ устанавливался врачами НУЗ ОКБ на ст. Петрозаводск ОАО «РЖД» на основании клинико-лабораторных, инструментальных исследований и гистологического исследования биоптатов печени, полученных при слепой чрескожной биопсии печени. Диагноз ревматоидного артрита устанавливался в соответствии с критериями Американской коллегии ревматологов (ACR) 1987 г.

Обследование доноров, включенных в дальнейшем в контрольную группу, проводилось врачами ГБУЗ «Больница скорой медицинской помощи» г. Петрозаводска в ходе диспансеризации. Критерии исключения из исследования: наличие сахарного диабета, перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, наличие достоверного диагноза другого ревматического заболевания до начала исследования, курение табака, беременность и лактация, алкогольная зависимость, индекс массы тела ≤ 28 кг/м². Дополнительный критерий исключения из биохимического анализа – гипотензивная, противовоспалительная и гепатотропная терапия. Все доноры являлись жителями Республики Карелия. На проведение исследований получено согласие Комитета по медицинской этике Минздравсоцразвития РК и ПетрГУ.

ДНК выделяли с помощью набора AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit («Axygen», США). Генотипирование проводилось методом ПЦР-ПДРФ. Для амплификации промоторной части гена *TNF*, включающей позицию -308, использовали праймеры, описанные в работе [Ito et al., 2000]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), используя реакционную смесь Master Mix (ThermoFisher, Германия). ПЦР-продукты, соответствующие участку гена *TNF*, обрабатывали эндонуклеазой рестрикции NcoI (1 е.а.) («Fermentas», Латвия) в течение 3 ч при 37 °С. Продукты рестрикции разделяли в 6%-м полиакриламидном геле, используя трис-ацетатный буфер. Концентрацию в плазме крови общего холестерина (ОХС), триглицеридов, холестерина липопротеинов высокой

плотности определяли в автоматическом режиме на биохимическом анализаторе «COBAS INTEGRA 400 PLUS» («Roshe Diagnostics GmbH», ФРГ-Австрия-США), холестерина липопротеинов низкой плотности – расчетным методом по [Friedewald et al., 1972].

Содержание TNF α в периферической крови больных ЭАГ и доноров контрольной группы определяли методом неконкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем «Human TNF- α Platinum ELISA» («eBioscience», Австрия). Забор крови проводили утром, натощак. Результаты исследования регистрировались на иммуноферментном анализаторе «Sunrise» («Tecan», Швейцария).

Для ИФА группы сравнения составили 38 здоровых жителей Республики Карелия, подобранные по принципу случайной выборки, не имевшие на момент обследования клинических признаков ЭАГ, НАСГ и РА (из них 15 – мужчины и 23 – женщины), 28 пациентов (13 мужчин и 15 женщин) с установленным диагнозом ЭАГ (I-II стадии), 40 пациентов с диагнозом НАСГ (21 мужчина и 19 женщин), 20 пациентов с РА (12 женщин и 8 мужчин). Возраст доноров контрольной группы составил $35,70 \pm 7,30$ года; пациентов с диагнозом ЭАГ – $38,60 \pm 6,10$; пациентов с диагнозом НАСГ – $46,28 \pm 1,51$; пациентов с диагнозом РА – $50,00 \pm 4,51$.

Статистическая обработка материала проведена с использованием программного обеспечения «StatGraphics 2.1». Для оценки различий биохимических показателей в группах исследования использовали непараметрический критерий U Вилкоксона–Манна–Уитни. Использован дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$. Возраст доноров указан в виде средних значений и стандартной ошибки среднего. Показатели концентрации цитокинов приведены в виде средних со стандартной ошибкой.

Исследования выполнены на научном оборудовании ЦКП НО Института биологии КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

Результаты

Как показали результаты наших исследований, уровень TNF α у пациентов с ЭАГ (I-II стадии), ревматоидным артритом, НАСГ был достоверно выше, чем у доноров контрольной группы (табл. 1).

Показано, что у больных ЭАГ (I-II стадии) уровень ТГ достоверно выше, а уровень ЛПВП

Таблица 1. Содержание TNF α в группах исследования

Группа	Концентрация TNF α , среднее значение, пг/мл	Медиана	Минимум	Максимум	Межквартильный размах	Значение p (при p < 0,05)
Контрольная	3,60 \pm 0,29	3,37	2,00	9,00	2,08	
ЭАГ	25,64 \pm 2,68	18,86	7,10	55,80	17,60	*0,000000017
РА	7,70 \pm 0,94	7,00	4,15	11,23	3,30	*0,0027
НАСГ	6,22 \pm 0,36	5,98	3,57	16,67	2,11	*0,0312

Примечание. * Достоверные отличия по сравнению с контролем.

Таблица 2. Липидный состав плазмы доноров

Показатель липидного спектра	Группа	M \pm m, ммоль/л	Медиана	Минимум	Максимум	Межквартильный размах	Значение p (при p < 0,05)
ОХС, ммоль/л	контроль	6,30 \pm 0,24	6,02	3,08	11,85	3,20	
	ЭАГ	6,37 \pm 0,24	5,70	2,40	16,00	3,10	
	НАСГ	6,10 \pm 0,14	6,10	3,75	8,30	1,37	
	РА	5,60 \pm 0,20	5,49	3,45	7,90	1,12	
ХС-ЛПВП, ммоль/л	контроль	1,82 \pm 0,16	1,40	0,60	8,30	0,73	
	ЭАГ	1,25 \pm 0,04	1,20	0,24	2,30	0,40	* 0,0005
	НАСГ	1,38 \pm 0,08	1,26	0,46	2,48	0,72	
	РА	1,38 \pm 0,09	1,36	0,69	3,68	0,42	
ХС-ЛПНП, ммоль/л	контроль	3,86 \pm 0,23	3,73	0,60	8,46	2,75	
	ЭАГ	4,22 \pm 0,20	3,90	0,39	10,30	2,82	
	НАСГ	4,24 \pm 0,17	4,01	2,56	7,00	1,40	* 0,0477
	РА	3,50 \pm 0,17	3,52	1,57	5,56	1,30	
ТГ, ммоль/л	контроль	1,51 \pm 0,14	1,30	0,48	7,53	1,00	
	ЭАГ	2,02 \pm 0,16	1,47	0,39	5,18	1,11	*0,03
	НАСГ	1,67 \pm 0,13	1,56	0,78	2,69	0,94	* 0,0370
	РА	1,74 \pm 0,23	1,39	0,39	8,37	0,66	

Примечание. * Достоверные отличия по сравнению с контролем.

достоверно ниже, чем у доноров контрольной группы (табл. 2). В группе пациентов с диагнозом НАСГ содержание в плазме ТГ и ЛПНП выше, чем у здоровых доноров. Другие показатели липидного спектра в плазме доноров из обследованных групп, в том числе и больных ревматоидным артритом, достоверно не отличались.

Исследовано влияние генотипа по -308G>A полиморфному маркеру гена *TNF* на содержание отдельных фракций липидов в плазме крови здоровых и больных ЭАГ, НАСГ и РА людей (табл. 3). В контрольной группе доноров влияние генотипа по -308G>A полиморфному маркеру гена *TNF* на состав липидов не обнаружено. У гипертензивных доноров, имеющих GA и AA генотипы по данному маркеру гена *TNF*, уровень ЛПВП был достоверно ниже. Проведен дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса, который выявил влияние генотипа по полиморфному маркеру -308G>A гена *TNF* на уровень ЛПВП в плазме крови у больных ЭАГ (N = 5,65; p = 0,0174). У пациентов с НАСГ, имеющих в генотипе аллель A, уровень холестерина был ниже, чем у носителей GG генотипа. Дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса

позволил выявить влияние генотипа по полиморфному маркеру -308G>A гена *TNF* на уровень ОХС в плазме крови у больных НАСГ (N = 3,88; p = 0,0488). Не обнаружено влияние замены гуанина на аденин в -308 позиции промотора гена *TNF* на состав липидов у больных ревматоидным артритом.

Обсуждение

Изменение липидного состава крови, в частности гиперхолестеринемия, не только является значительным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, но и в последнее время рассматривается в качестве одного из возможных механизмов, вовлеченных в патогенез атеросклероза у пациентов с ревматоидным артритом [Nahn et al., 2007; Ройтберг и др., 2011]. У больных неинфекционными заболеваниями печени, в том числе и неалкогольным стеатогепатитом, также наблюдается развитие атерогенной дислипидемии, которая вносит свой вклад в прогрессирование данного заболевания [Шульпекова, 2012]. Эссенциальная артериальная гипертензия, ревматоидный артрит и неалкогольный стеатогепатит

Таблица 3. Липидный состав плазмы доноров в зависимости от генотипа по -308G>A полиморфному маркеру гена *TNF*

Показатель липидного спектра	Группа	Генотипы	Среднее значение, ммоль/л	Медиана	Минимум	Максимум	Межквартильный размах
ОХС, ммоль/л	контроль	GG (54)	6,22 ± 0,30	5,87	3,20	11,85	3,34
		GA+AA (21)	6,53 ± 0,40	6,18	3,08	9,60	2,90
	ЭАГ	GG (94)	6,27 ± 0,26	5,60	2,40	16,00	2,80
		GA+AA (19)	6,84 ± 0,59	6,40	3,40	12,00	4,20
	НАСГ	GG (46)	6,26 ± 0,18	6,20	3,75	8,30	0,98
		GA+AA (22)	5,74 ± 0,22*	5,77	4,10	7,46	1,07
	РА	GG (25)	5,51 ± 0,23	5,41	3,45	7,90	1,06
		GA+AA (9)	5,70 ± 0,42	5,57	3,79	7,72	1,28
ХС-ЛПВП, ммоль/л	контроль	GG	1,76 ± 0,18	1,40	0,60	8,30	0,50
		GA+AA	1,96 ± 0,30	1,36	0,90	5,50	0,92
	ЭАГ	GG	1,29 ± 0,04	1,23	0,24	2,30	0,36
		GA+AA	1,07 ± 0,07**	1,03	0,67	1,74	0,36
	НАСГ	GG	1,44 ± 0,09	1,29	0,88	2,48	0,64
		GA+AA	1,24 ± 0,13	1,17	0,46	2,08	0,70
	РА	GG	1,35 ± 0,07	1,37	0,69	2,26	0,36
		GA+AA	1,50 ± 0,28	1,33	0,90	3,68	0,35
ХС-ЛПНП, ммоль/л	контроль	GG	4,05 ± 0,29	3,89	0,60	8,46	2,70
		GA+AA	3,43 ± 0,35	3,36	1,08	5,65	2,91
	ЭАГ	GG	4,13 ± 0,21	3,87	0,39	10,30	2,75
		GA+AA	4,65 ± 0,50	4,30	2,00	8,90	3,40
	НАСГ	GG	4,31 ± 0,24	4,00	2,62	7,00	1,60
		GA+AA	4,11 ± 0,26	4,11	2,56	5,90	1,34
	РА	GG	3,53 ± 0,19	3,52	1,84	5,56	0,81
		GA+AA	3,41 ± 0,39	3,38	1,57	5,04	1,54
ТГ, ммоль/л	контроль	GG	1,39 ± 0,16	1,22	0,48	7,53	0,90
		GA+AA	1,78 ± 0,29	1,42	0,60	6,40	1,13
	ЭАГ	GG	1,73 ± 0,11	1,45	0,39	5,18	1,09
		GA+AA	1,75 ± 0,22	1,63	0,65	4,10	0,87
	НАСГ	GG	1,67 ± 0,15	1,59	0,89	2,69	0,93
		GA+AA	1,66 ± 0,29	1,56	0,78	2,66	1,55
	РА	GG	1,75 ± 0,31	1,41	0,39	8,37	0,66
		GA+AA	1,68 ± 0,26	1,39	0,98	3,51	0,68

Примечание. Достоверные отличия по сравнению с носителями генотипа GG: *p = 0,0250, **p = 0,0176.

относятся к воспалительным заболеваниям и сопровождаются увеличением продукции провоспалительных факторов [Kugelmas et al., 2003; Bautista et al., 2005; Brennan, McInnes, 2008]. Оказалось, что уровень провоспалительных белков, таких как фактор некроза опухоли, интерлейкин-6, в организме может влиять на липидный обмен [Feingold, Grunfeld, 1992; Nopogaki et al., 1995]. Увеличение в плазме крови концентрации провоспалительных цитокинов сопровождается нарушением образования, обмена и выведения из циркуляции липопротеинов и жиров (дислипидемией). Особенно эти изменения регистрируются в ходе острой фазы воспаления, сопровождающейся усилением синтеза белков острой фазы, в том числе и С-реактивного белка, например, у больных ревматоидным артритом и пациентов с инсулинорезистентным синдромом [Hotamisligil et al., 1993]. Как показано в нашем исследовании,

у больных ЭАГ (I-II стадии) в плазме крови регистрируется высокий уровень TNFα, пониженный уровень холестерина липопротеинов высокой плотности и повышенный уровень триглицеридов. У пациентов с неалкогольным стеатогепатитом в плазме крови также значительно повышено содержание этого цитокина, ХС-ЛПНП и триглицеридов по сравнению с контрольной группой. Только у больных ревматоидным артритом не зарегистрировано изменение профиля липидов на фоне повышенного содержания TNFα. Изменения липидного профиля и повышение уровня фактора некроза опухоли в плазме крови могут свидетельствовать о взаимосвязи этих процессов. Действительно, согласно литературным данным, инъекция TNFα экспериментальным животным или пациентам вызывает быстрый и стабильный подъем уровня триглицеридов [Feingold et al., 1990]. Помимо этого, содержание данной

фракции липидов положительно коррелирует с высоким уровнем в плазме крови TNF α [Feingold et al., 1990; Zinman et al., 1999]. Фактор некроза опухоли альфа может способствовать повышению в плазме крови уровня ТГ напрямую, стимулируя рост концентрации свободных жирных кислот как в жировой, так и в печеночной ткани [Feingold, Grunfeld, 1992]. Другой механизм, через который данный цитокин увеличивает уровень ТГ плазмы, – уменьшение активности липазы липопротеинов в адипоцитах, что влечет за собой сокращение гидролиза и выведения липопротеинов, богатых триглицеридами. Медиаторы воспаления влияют на активность и других ферментов, принимающих участие в обмене липопротеинов, например, липопротеин-ассоциированной фосфолипазы А2, фосфолипазы Д и печеночной липазы [Kern, 1995; Adibhatla et al., 2008]. Фактор некроза опухоли альфа может индуцировать повышение активности липопротеиновой фосфолипазы А2, обладающей ацетилгидролазной активностью. Этот фермент гидролизует окисленные фосфолипиды, например, окисленный фосфатидилхолин ЛПНП с образованием окисленных жирных кислот и лизофосфатидилхолина. Повышенное образование последнего ассоциируется с эндотелиальной дисфункцией и играет важную роль в воспалении сосудов, формировании и дестабилизации атеросклеротических бляшек [Adibhatla et al., 2008]. Помимо этого, TNF α способен активировать сфингомиелиназу, гидролизующую сфинголипиды. Повышение ее активности способствует выходу церамидов, которые играют важную роль в агрегации липопротеинов низкой плотности внутри артерий [Adibhatla et al., 2008].

Фактор некроза опухоли способен влиять не только на уровень триглицеридов в плазме крови, но и на содержание других липидов. В частности, увеличение содержания TNF α в плазме крови сопровождается понижением уровня ХС-ЛПВП и повышением концентрации ХС-ЛПНП, возможно, за счет торможения распада и элиминации последних. Важным фактором атерогенеза является окисление ЛПНП. Показано, что увеличение концентрации в крови фактора некроза опухоли сопровождается значительным накоплением окисленных форм липопротеинов низкой плотности, являющихся хемоаттрактантами для макрофагов, формирующих атеросклеротические бляшки [Paik et al., 2013]. TNF α подавляет экспрессию генов и белков «scavenger» рецепторов, распознающих окисленные или ацетилированные липопротеины низкой плотности, что приводит к снижению поглощения ЛПНП макрофагами [Tedgui, Mallat, 2006].

Указанные изменения профиля липидов и накопление окисленных форм ЛП способствуют развитию атеросклероза и повышению давления крови не только при сердечно-сосудистых, но и при других заболеваниях, в том числе ревматоидном артрите и неинфекционных заболеваниях печени. Считается, что на развитие атеросклероза оказывают влияние ряд факторов, такие как вирусные или бактериальные инфекционные заболевания, возраст, зависимость от табака и прочие. Однако приблизительно в половине случаев одно из наиболее ярких клинических проявлений атеросклероза – стенокардия – впервые возникает на фоне отсутствия большинства модифицируемых факторов риска [Пасечник и др., 2011]. Этот факт указывает на наличие генетической предрасположенности к развитию атеросклероза.

Ген, кодирующий TNF α , является геном-кандидатом, чьи полиморфные варианты могут вносить вклад в развитие сердечно-сосудистых и других полигенных заболеваний [Zee et al., 2006; Li, 2012]. Наиболее изучено влияние -308G>A полиморфизма гена *TNF* на уровень его экспрессии и развитие ряда патологий [Abraham, Kroeger, 1999]. Замена гуанина на аденин в позиции -308, по данным литературы, приводит к увеличению транскрипционной активности гена *TNF* [Wilson et al., 1997]. Так, в исследовании Fernandes с соавторами показано, что у носителей генотипа AA синтез белка происходит в три раза активнее, чем у лиц с генотипом GG [Fernandes et al., 2002]. По результатам исследования, проведенного в Испании, у пациентов, страдающих неалкогольной болезнью печени и имеющих в генотипе аллель А, уровень TNF α в плазме крови выше, чем у носителей аллеля G, что позволяет предполагать патологическую роль мутации 308G>A [Aller et al., 2010]. Другие авторы, напротив, предполагают протекторную роль генотипа AA в патогенезе заболеваний печени, например, хронического гепатита В [Zheng et al., 2010]. Эти данные подтверждают тот факт, что наличие или отсутствие ассоциации того или иного генотипа с развитием заболевания зависит от этнической принадлежности обследованных доноров. Ранее нами показано, что у больных ЭАГ, имеющих GG генотип, содержание TNF α в плазме крови выше, чем у носителей других генотипов [Топчиева и др., 2014]. В то же время имеются работы, в которых не выявлена связь уровня транскриптов гена *TNF* и содержания кодируемого им белка с генотипами по изучаемому маркеру как у здоровых, так и у больных доноров [Mekinian et al., 2011]. Такие же противоречивые данные

получены и относительно влияния -308G>A полиморфизма гена *TNF* на состав липидов плазмы крови [Hermann et al., 1998; Gander, 2004; Jeanmonod et al., 2004; Sookoian et al., 2005; Aller et al., 2010]. Одни авторы обнаружили изменения липидного профиля в зависимости от наличия в генотипе разных аллелей по указанному маркеру [Hermann et al., 1998], другие – нет [Gander et al., 2004]. В некоторых работах отмечена только тенденция к изменению уровня триглицеридов и фракций холестерина у доноров, имеющих в генотипе или А или G аллель [Sheu et al., 2000]. Как показано в нашей работе, в группе здоровых доноров и пациентов с РА уровень исследованных фракций липидов не зависел от генотипа по -308G>A маркеру гена *TNF*. Влияние генотипа по указанному полиморфному маркеру на состав липидов выявлено в группах пациентов с ЭАГ и НАСГ.

Из данных литературы не совсем понятно, с каким именно аллелем ассоциируется повышение или снижение содержания липидов плазмы крови. Проатерогенное влияние на липидный состав чаще приписывают аллелю А [Ройтберг и др., 2011]. В то же время имеются исследования, демонстрирующие уменьшение содержания ТГ и ОХ у носителей GA+AA генотипов [Sheu et al., 2000]. В нашей работе мы также не получили данных, которые однозначно указывали бы на проатерогенное влияние аллеля А на липидный состав плазмы крови. У больных НАСГ, имеющих в генотипе аллель А, уровень общего холестерина был ниже, чем у носителей GG генотипа. Только у пациентов с ЭАГ (I-II стадии), имеющих в генотипе аллель А, отмечено снижение антиатерогенной фракции липидов – ХС-ЛПВП.

Заключение

В целом можно сказать, что повышение уровня фактора некроза опухоли в плазме крови при эссенциальной артериальной гипертензии и неалкогольном стеатогепатите способствует изменению состава липидов в сторону повышения проатерогенных фракций. Выявленное влияние однонуклеотидной замены в -308 позиции промотора гена *TNF* на уровень общего холестерина и холестерина липопротеинов высокой плотности свидетельствует о наличии генетической предрасположенности больных этими заболеваниями к нарушению синтеза и обмена липидов.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного

задания (тема № 0221-2014-0008). Работа поддержана стипендией Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2015–2017 гг.

Литература

Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Российские рекомендации (IV пересмотр) / Российское медицинское общество по артериальной гипертензии. Всероссийское научное общество кардиологов // Системные гипертензии. 2010. № 3. С. 5–26.

Новикова Д. С., Попкова Т. В., Насонов Е. Л. Артериальная гипертензия при ревматоидном артрите // Научно-практическая ревматология. 2011, № 3. С. 52–68.

Пасечник А. В., Моисеева Е. Г., Фролов В. А., Дроздова Г. А. Пародонтит и метаболические нарушения: Учебно-методическое пособие. М.: РУДН, 2011. 30 с.

*Ройтберг Г. Е., Дорош Ж. В., Шархун О. О. и др. Взаимосвязь полиморфизма гена *TNF-α* с клинико-лабораторными проявлениями синдрома инсулинорезистентности // Профилактическая медицина. 2011, № 2. С. 62–66.*

*Топчиева Л. В., Малышева И. Е., Курбатова И. В. и др. Анализ ассоциации полиморфного маркера -308G>A гена *TNF* с развитием эссенциальной артериальной гипертензии у жителей Карелии // Медицинская генетика. 2014. Т. 13, № 12. С. 11–15.*

Шульпекова Ю. О. Патогенетическое значение липидов при неалкогольной жировой болезни печени // РЖГГК. 2012. Т. 22, № 1. С. 45–56.

Abraham L. J., Kroeger K. M. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease // J. Leuk. Biol. 1999. Vol. 66. P. 562–566.

Adibhatla R. M., Dempsey R., Hatcher J. F. Integration of cytokine biology and lipid metabolism in stroke // Front Biosci. 2008. Vol. 13. P. 1250–1270.

Aller R., de Luis D. A., Izaola O. et al. G308A polymorphism of TNF-alpha gene is associated with insulin resistance and histological changes in non alcoholic fatty liver disease patients // Ann. Hepatol. 2010. Vol. 9, No 4. P. 439–444.

Bautista L. E., Vera L. M., Arenas I. A., Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-α) and essential hypertension // J. Hum. Hypert. 2005. Vol. 19. P. 149–154.

Braunersreuther V., Viviani G. L., Mach F., Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease // World J. Gastroenterol. 2012. Vol. 18, No 8. P. 727–735. doi: 10.3748/wjg.v18.i8.727.

Brennan F. M., McInnes I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis // J. Clin. Invest. 2008. Vol. 118, No 11. P. 3537–3545. doi:10.1172/JCI36389.

Fargion S., Porzio M., Fracanzani A. L. Nonalcoholic fatty liver disease and vascular disease: state-of-the-art // *World J. Gastroenterol.* 2014. Vol. 20, No 37. P. 13306–13324. doi: 10.3748/wjg.v20.i37.13306.

Feingold K., Grunfeld C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia // *Diabetes.* 1992. Vol. 41, suppl. 2. P. 97–101.

Feingold K. R., Soued M., Adi S., Staprans I., Shigenaga J., Doerrler W., Moser A., Grunfeld K. Tumor necrosis factor – increased hepatic very-low-density lipoprotein production and increased serum triglyceride levels in diabetic rats // *Diabetes.* 1990. Vol. 39. P. 1569–1574.

Fernandes H., Koneru B., Fernandes N. et al. Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients // *Transplantation.* 2002. Vol. 73, No 12. P. 1886–1891.

Friedewald W. T., Levy I., Fredrickson D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge // *Clin. Chem.* 1972. Vol. 18, No 6. P. 499–502.

Gander M.-L., Fischer J. E., Maly F. E., von Känel R. Effect of the G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)- α gene promoter site on plasma levels of TNF- α and C-reactive protein in smokers: a cross-sectional study // *BMC Cardiovascular Disorders.* 2004. Vol. 4, No 17. doi:10.1186/1471-2261-4-17.

Hahn B. H., Grossman J., Chen W., McMahon M. The pathogenesis of atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases: roles of inflammation and dyslipidemia // *J. Autoimmun.* 2007. Vol. 28. P. 69–75. doi: 10.1016/j.jaut.2007.02.004.

Hermann S. M., Ricard S., Nicaud V. Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity // *Eur. J. Clin. Invest.* 1998. Vol. 28. P. 59–66.

Hotamisligil G. S., Shargill N. S., Spiegelman B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance // *Science.* 1993. Vol. 259. P. 87–91.

Ito H., Ohshima A., Tsuzuki M. et al. Association of serum tumour necrosis factor- α with serum low-density lipoprotein-cholesterol and blood pressure in apparently healthy Japanese women // *Cl. Exp. Pharm. Phys.* 2001. Vol. 28. P. 188–192.

Jeanmonod P., von Känel R., Maly F. E., Fischer J. E. Elevated plasma C-reactive protein in chronically distressed subjects who carry the A allele of the TNF- α -308G/A polymorphism // *Psychosomatic Medicine.* 2004. Vol. 66. P. 501–506.

Kern P. A., Saghizadeh M., Ong J. M. et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase // *J. Clin. Invest.* 1995. Vol. 95, No 5. P. 2111–2119.

Kugelmas M., Hill D. B., Vivian B., Marsano L., McClain C. J. Cytokines and NASH: a pilot study of the

effects of lifestyle modification and vitamin E // *Hepatology.* 2003. Vol. 38, No 2. P. 413–419.

Li Y.-Y. Tumor necrosis factor-alpha G308A gene polymorphism and essential hypertension: a meta-analysis involving 2244 participants // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, No 4. e35408. doi: 10.1371/journal.pone.0035408.

Mekinian A., Tamouza R., Pavy S. et al. Functional study of TNF- α promoter polymorphisms: literature review and meta-analysis // *Eur. Cytokine Netw.* 2011. Vol. 22, No 2. P. 88–102. doi: 10.1684/ecn.2011.0285.

Nonogaki K., Fuller G. M., Fuentes N. L. et al. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats // *Endocrinology.* 1995. Vol. 136. P. 2143–2149.

Paik J. K., Chae J. S., Kang R., Kwon N., Lee S.-H., Lee J. H. Effect of age on atherogenicity of LDL and inflammatory markers in healthy women // *Nutr. Metab. And Cardiovasc. Diseases.* 2013. Vol. 23. P. 967–972.

Sheu W. H. H., Lee W. J., Chang R. L. et al. Plasma tumor necrosis factor alpha levels and insulin sensitivity in hypertensive subjects // *Clin. Exp. Hypertens.* 2000. Vol. 22. P. 595–606.

Skoog T., Dichtl W., Boquist S. et al. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men // *Eur. Heart J.* 2002. Vol. 23, No 5. P. 376–383.

Sookoian S., Garcia S. I., Gianotti T. F. et al. The G-308A promoter variant of the tumor necrosis factor-alpha gene is associated with hypertension in adolescents harboring the metabolic syndrome // *Am. J. Hypertens.* 2005. Vol. 18, No 10. P. 1271–1275.

Tedgui A., Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways // *Physiol. Rev.* 2006. Vol. 86, No 2. P. 515–581.

Wilson A. G., Symons J. A., Grall F. et al. Effect of a polymorphisms in the human tumor necrosis factor α on transcriptional activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94. P. 3195–3199.

Yoshida S., Takeuchi T., Kotani T. et al. Infliximab, a TNF- α inhibitor, reduces 24-h ambulatory blood pressure in rheumatoid arthritis patients // *J. Hum. Hypertens.* 2014. Vol. 28, No 3. P. 165–169. doi: 10.1038/jhh.2013.80.

Zee R. Y., Cook N. R., Cheng S. Multi-locus candidate gene polymorphisms and risk of myocardial infarction: a population-based, prospective genetic analysis // *J. Thromb. Haemost.* 2006. Vol. 4. P. 341–348.

Zheng M. H., Qiu L. X., Xin Y. N. et al. Tumor necrosis factor-alpha-308A allele may have a protective effect for chronic hepatitis B virus infection in Mongoloid populations // *Int. J. Infect. Dis.* 2010. Vol. 4, No 7. P. 580–585. doi: 10.1016/j.ijid.2009.08.010.

Zinman B., Hanley A. J., Harris S. B. et al. Tumor necrosis factor concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus // *J. Clin. Endocrin. Met.* 1999. Vol. 84, No 1. P. 272–278.

Поступила в редакцию 17.06.2015

References

Diagnostika i lechenie arterial'noi gipertenzii [Diagnosics and treatment of arterial hypertension]. Rossiiskie rekomendatsii (IV peresmotr). Rossiiskoe meditsinskoe obshchestvo po arterial'noi gipertonii. Vserossiiskoe nauchnoe obshchestvo kardiologov. *Sistemnye gipertenzii* [Russian recommendations (fourth revision)]. Russian medical society on arterial hypertension. All-Russian scientific society of cardiologists. *Systemic hypertension*. 2010. No 3. P. 5–26.

Novikova D. S., Popkova T. V., Nasonov E. L. Arterial'naya gipertenziya pri revmatoidnom artrite [Arterial hypertension in rheumatoid arthritis]. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya* [Science-practical rheumatology]. 2011. No 3. P. 52–68.

Pasechnik A. V., Moiseeva E. G., Frolov V. A., Drozdova G. A. Parodontit i metabolicheskie narusheniya: Uchebno-metodicheskoe posobie [Inflammation and metabolic damage. Manual]. Moscow: RUDN, 2011. 30 p.

Roitberg G. E., Dorosh Zh. V., Sharkhun O. O., Ushakova T. I., Serebryakova O. E. Vzaimosvyaz' polimorfizma gena TNF- α s kliniko-laboratornymi proyavleniyami sindroma insulinorezistentnosti [Relationship between the TNF- α gene polymorphism and the clinical and laboratory manifestation of insulin resistance syndrome]. *Profilakticheskaya meditsina* [Preventive medicine]. 2011. No 2. P. 62–66.

Shul'pekova Yu. O. Patogeneticheskoe znachenie lipidov pri nealkogol'noi zhirovoi bolezni pecheni [The pathogenic significance of lipids with nonalcoholic fatty liver disease]. *RZhGGK*. 2012. Vol. 22, No 1. P. 45–56.

Topchieva L. V., Malysheva I. E., Kurbatova I. V., Korneva V. A., Stepanova A. I., Nemova N. N. Analiz assotsiatsii polimorfnoogo markera -308G>A gena TNF s razvitiem essential'noi arterial'noi gipertenzii u zhitelei Karelii [The analysis of the association of -308G>A polymorphic marker of the TNF gene with the development of essential hypertension in Karelian inhabitants]. *Meditsinskaya genetika* [Medical genetics]. 2014. Vol. 13, No 12. P. 11–15.

Abraham L. J., Kroeger K. M. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J. Leuk. Biol.* 1999. Vol. 66. P. 562–566.

Adibhatla R. M., Dempsey R., Hatcher J. F. Integration of cytokine biology and lipid metabolism in stroke. *Front Biosci.* 2008, Vol. 13. P. 1250–1270.

Aller R., de Luis D. A., Izaola O. et al. G308A polymorphism of TNF-alpha gene is associated with insulin resistance and histological changes in non alcoholic fatty liver disease patients. *Ann. Hepatol.* 2010. Vol. 9, No 4. P. 439–444.

Bautista L. E., Vera L. M., Arenas I. A., Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- α) and essential hypertension. *J. Hum. Hypert.* 2005. Vol. 19. P. 149–154.

Braunersreuther V., Viviani G. L., Mach F., Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 2012. Vol. 18, No 8. P. 727–735. doi: 10.3748/wjg.v18.i8.727.

Brennan F. M., McInnes I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 2008. Vol. 118, No 11. P. 3537–3545. doi: 10.1172/JCI36389.

Fargion S., Porzio M., Fracanzani A. L. Nonalcoholic fatty liver disease and vascular disease: state-of-the-art. *World J. Gastroenterol.* 2014. Vol. 20, No 37. P. 13306–13324. doi: 10.3748/wjg.v20.i37.13306.

Feingold K., Grunfeld C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. *Diabetes.* 1992. Vol. 41, suppl. 2. P. 97–101.

Feingold K. R., Soued M., Adi S., Staprans I., Shigenaga J., Doerrler W., Moser A., Grunfeld K. Tumor necrosis factor – increased hepatic very-low-density lipoprotein production and increased serum triglyceride levels in diabetic rats. *Diabetes.* 1990. Vol. 39. P. 1569–1574.

Fernandes H., Koneru B., Fernandes N. et al. Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients. *Transplantation.* 2002. Vol. 73, No 12. P. 1886–1891.

Friedewald W. T., Levy I., Fredrickson D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972. Vol. 18, No 6. P. 499–502.

Gander M.-L., Fischer J. E., Maly F. E., von Känel R. Effect of the G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)- α gene promoter site on plasma levels of TNF- α and C-reactive protein in smokers: a cross-sectional study. *BMC Cardiovascular Disorders.* 2004. Vol. 4, No 17. doi: 10.1186/1471-2261-4-17.

Hahn B. H., Grossman J., Chen W., McMahon M. The pathogenesis of atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases: roles of inflammation and dyslipidemia. *J. Autoimmun.* 2007. Vol. 28. P. 69–75. doi: 10.1016/j.jaut.2007.02.004.

Hermann S. M., Ricard S., Nicaud V. Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. *Eur. J. Clin. Invest.* 1998. Vol. 28. P. 59–66.

Hotamisligil G. S., Shargill N. S., Spiegelman B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993. Vol. 259. P. 87–91.

Ito H., Ohshima A., Tsuzuki M., Ohto N. et al. Association of serum tumour necrosis factor- α with serum low-density lipoprotein-cholesterol and blood pressure in apparently healthy Japanese women. *Cl. Exp. Pharm. Phys.* 2001. Vol. 28. P. 188–192.

Jeanmonod P., von Känel R., Maly F. E., Fischer J. E. Elevated plasma C-reactive protein in chronically distressed subjects who carry the A allele of the TNF- α -308G/A polymorphism. *Psychosomatic Medicine.* 2004. Vol. 66. P. 501–506.

Kern P. A., Saghizadeh M., Ong J. M., Bosch R. J., Deem R., Simsolo R. B. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.* 1995. Vol. 95, No 5. P. 2111–2119.

Kugelmas M., Hill D. B., Vivian B., Marsano L., McClain C. J. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology.* 2003. Vol. 38, No 2. P. 413–419.

Li Y.-Y. Tumor necrosis factor-alpha G308A gene polymorphism and essential hypertension: a meta-analysis involving 2244 participants. *PLoS One*. 2012. Vol. 7, No 4. e35408. doi: 10.1371/journal.pone.0035408.

Mekinian A., Tamouza R., Pavy S. et al. Functional study of TNF- α promoter polymorphisms: literature review and meta-analysis. *Eur. Cytokine Netw.* 2011. Vol. 22, No 2. P. 88–102. doi: 10.1684/ecn.2011.0285.

Nonogaki K., Fuller G. M., Fuentes N. L. et al. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology*. 1995. Vol. 136. P. 2143–2149.

Paik J. K., Chae J. S., Kang R., Kwon N., Lee S.-H., Lee J. H. Effect of age on atherogenicity of LDL and inflammatory markers in healthy women. *Nutr. Metab. And Cardiovasc. Diseases*. 2013. Vol. 23. P. 967–972.

Sheu W. H. H., Lee W. J., Chang R. L. et al. Plasma tumor necrosis factor alpha levels and insulin sensitivity in hypertensive subjects. *Clin. Exp. Hypertens*. 2000. Vol. 22. P. 595–606.

Skoog T., Dichl W., Boquist S. et al. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *Eur. Heart J.* 2002. Vol. 23, No 5. P. 376–383.

Sookoian S., Garcia S. I., Gianotti T. F. et al. The G-308A promoter variant of the tumor necrosis factor-alpha gene is associated with hypertension in adolescents harboring the metabolic syndrome. *Am. J. Hypertens*. 2005. Vol. 18, No 10. P. 1271–1275.

Tedgui A., Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* 2006. Vol. 86, No 2. P. 515–581.

Wilson A. G., Symons J. A., Grall F. et al. Effect of a polymorphisms in the human tumor necrosis factor α on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. Vol. 94. P. 3195–3199.

Yoshida S., Takeuchi T., Kotani T., Yamamoto N. et al. Infliximab, a TNF- α inhibitor, reduces 24-h ambulatory blood pressure in rheumatoid arthritis patients. *J. Hum. Hypertens*. 2014. Vol. 28, No 3. P. 165–169. doi: 10.1038/jhh.2013.80.

Zee R. Y., Cook N. R., Cheng S. Multi-locus candidate gene polymorphisms and risk of myocardial infarction: a population-based, prospective genetic analysis. *J. Thromb. Haemost.* 2006. Vol. 4. P. 341–348.

Zheng M. H., Qiu L. X., Xin Y. N., Pan H. F., Shi K. Q., Chen Y. P. Tumor necrosis factor-alpha-308A allele may have a protective effect for chronic hepatitis B virus infection in Mongoloid populations. *Int. J. Infect. Dis.* 2010. Vol. 4, No 7. P. 580–585. doi: 10.1016/j.ijid.2009.08.010.

Zinman B., Hanley A. J., Harris S. B. et al. Tumor necrosis factor concentrations in a native canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrin. Met.* 1999. Vol. 84, No.1. P. 272–278.

Received June 17, 2015

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

Курбатова Ирина Валерьевна

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) 769810

Малышева Ирина Евгеньевна

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

Корнева Виктория Алексеевна

доцент, к. м. н.
Петрозаводский государственный университет,
медицинский факультет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Карелия, Россия, 185910
эл. почта: vikkorneva@mail.ru
тел.: (8142) 780685

CONTRIBUTORS:

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

Kurbatova, Irina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: irina7m@yandex.ru
tel.: (8142) 769810

Malysheva, Irina

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

Korneva, Viktoria

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: vikkorneva@mail.ru
tel.: (8142) 780685

Барышева Ольга Юрьевна

профессор, д. м. н.
Петрозаводский государственный университет,
медицинский факультет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: olvar@karelia.ru
тел.: (8142) 764288

Дуданова Ольга Петровна

зав. кафедрой, д. м. н., проф.
Петрозаводский государственный университет,
медицинский факультет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: odudanova@gmail.com
тел.: (8142) 714684

Barysheva, Olga

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: olvar@karelia.ru
tel.: (8142) 764288

Dudanova, Olga

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: odudanova@gmail.com
tel.: (8142) 714684

ВОСПОМИНАНИЯ

НИКОГДА НЕ ЗАБЫВАЛ Я СОЛОМОНА САМУИЛОВИЧА ШУЛЬМАНА – ОДНОГО ИЗ СВОИХ ПЕРВЫХ РУКОВОДИТЕЛЕЙ

Как свидетельствует запись в трудовой книжке, с 12 августа по 1 октября 1955 г. в соответствии с приказом № 112 от 18 августа 1955 г. директора Института биологии Карело-Финского филиала АН СССР доктора биологических наук, профессора Юрия Ивановича Полянского служил я временным лаборантом и в этой должности принимал участие в исследованиях паразитов рыб сязозерской группы озер – Кончаозера, Шотозера, Сязозера и Выгозера – под руководством кандидата биологических наук, младшего научного сотрудника Соломона Самуиловича Шульмана (позже ставшего доктором биологических наук, профессором), ученика члена-корреспондента АН СССР, профессора Ленинградского университета Валентина Александровича Догеля, заведующего кафедрой зоологии беспозвоночных и, следовательно, выпускника широко известной как в России, так и во многих иных государствах Догелевской школы [см.: Слепян Э. И. Научная

школа Валентина Александровича Догеля // Биосфера: междисциплинарный научный и прикладной журнал по проблемам познания и сохранения биосферы и использования ее ресурсов. СПб.: Фонд научных исследований «XXI век», 2011. Т. 3, № 2. С. 208–214] – замечательного феномена в высшем университетском биологическом и экологическом образовании, приобщении студентов к биологическим и экологическим знаниям.

Волею судьбы оказался я в группе последнего по сроку завершения университетского образования выпуска кафедры зоологии беспозвоночных, занимавшегося под личным руководством В. А. Догеля и слушавшего его лекции. Здесь уместно подчеркнуть, что Патрон (как, любя и уважая Валентина Александровича бесконечно, между собой называли его все – и студенты, и преподаватели) своими лекциями, во-первых, всемерно обогащал зоологические и экологические знания и, во-вторых, давал повод задуматься над проблемами и их значением, которые никогда предметом его личных интересов не были, так как относились к тем аспектам деятельности и проблемам общества, которые в то время еще только возникали [Там же. С. 253–263].

Привлекательными к Валентину Александровичу всех, кто имел счастье с ним общаться, были его неприменная благожелательность, неизменные учтивость и внимательность по отношению ко всем, в том числе и к школьникам (на которых, включая меня, это оказывало очень большое впечатление).

Меня Валентин Александрович знал с тех пор, как я был учеником шестого класса широко



Соломон Самуилович Шульман



Лилия Николаевна Винниченко

известной в Ленинграде 222-й средней школы (исторической «Петершале») и занимался в Отделе науки Ленинградского дворца пионеров (в Юношеском географическом обществе и в Обществе юных натуралистов – так называемых в те годы юных мичуринцев).

Валентин Александрович никогда и ни с кем не говорил менторским тоном, не поучал, он был снисходителен к просчетам младших, никого и никогда не унижал, но был требователен и серьезен, а когда это было необходимо, был и высоко принципиален. Упомянутые его качества оказывались при сложных обстоятельствах жизни и деятельности весьма важными. Они были таковыми в те сроки, когда Валентин Александрович был не только заведующим кафедрой зоологии беспозвоночных, но и деканом биолого-почвенного факультета в годы лысенковщины.

Мой путь в экспедицию Соломона Самуиловича Шульмана не был прямолинейным и простым. В те дни, когда определялось предназначение экспедиции, устанавливался ее маршрут и формировался состав участников, я должен был находиться в Таджикистане, в г. Душанбе,

куда меня направили в соответствии с моим желанием и обращением к директору Зоологического института АН СССР академику Евгению Никаноровичу Павловскому после окончания Ленинградского университета. Я надеялся служить в заповеднике Кондара, подчиненным по научной тематике известному специалисту по тлям – афидологу Мухамедкулу Нарзикуловичу Нарзикулову, академику АН Таджикской ССР, директору Института зоологии и паразитологии имени академика Е. Н. Павловского Академии наук Таджикской ССР. Семью годами позже, в 1962 г., в Душанбе в Трудах Института зоологии и паразитологии имени академика Е. Н. Павловского (Том XXV) М. Н. Нарзикулов в многотомном издании «Фауна Таджикской ССР» (Том IX, вып. 1) опубликовал монографию «Тли (Homoptera, Aphididae) Таджикистана и сопредельных республик Средней Азии». Ущелье Кондара – великолепный заповедник, с богатейшей фауной не только позвоночных, но и беспозвоночных животных, в том числе и галлиц Cecidomyidae – объекта моих интересов и исследований со школьных лет [см. Ущелье Кондара (Опыт биологической монографии) / Редакторы Е. Н. Павловский и В. И. Жадин. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1951. 422 с.; Ущелье Кондара. Книга 2 / Ред. М. Н. Нарзикулов. Душанбе: Дониш, 1968. 218 с.]. К деятельности в заповеднике я серьезно подготовился и даже на средства мамы, всегда меня поддерживавшей, и собственные накопления приобрел микроскоп «М-9» и бинокулярную лупу, что в те годы было достаточно сложно. Незадолго до планируемого отъезда в Душанбе я оказался в Москве, где познакомился с выпускницей московского биофака Мирой Рубинчик, которой с восторгом рассказывал о планах намечаемых исследований. Но, увы, отправиться в ущелье Кондара мне не пришлось. По независящим от М. Н. Нарзикулова, меня и не известным мне и поныне причинам штатная



Справа – Эрик Иосифович Слепян



Справа – Галина Евгеньевна Окунева

единица, на которую планировалось мое зачисление, выделена не была. Надежды рухнули, я остался в Ленинграде и пошел на родную кафедру, где сразу же встретил преемника Патрона профессора Юрия Ивановича Полянского, которому обо всем происшедшем и поведал. Юрий Иванович, хорошо меня знавший также со школьных лет, подумал и решил направить меня в качестве временного лаборанта в состав экспедиции к Соломону Самуиловичу Шульману. Я был счастлив, так как и Соломона Самуиловича, и его коллегу и спутницу жизни Рахиль Ефремовну Шульман-Альбову хорошо знал и высоко ценил многие годы. Соломон Самуилович и Рахиль Ефремовна за несколько лет до описываемых событий детально исследовали ихтиопаразитов Белого моря и в 1953 г. по итогам осуществленных исследований опубликовали совместную фундаментальную монографию [см.: Шульман С. С., Шульман-Альбова Р. Е. Паразиты рыб Белого моря. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1953. 198 с.]. Таким образом, методология и технологии ихтиопаразитологических исследований на больших озерах Карелии были predetermined.

Соломон Самуилович – один из крупнейших не только в России, но и в мире специалистов по замечательной группе паразитических простейших, более чем опасных для рыб, – так называемым миксоспоридиям. Его перу принадлежит хорошо известная всем ихтиопаразитологам монография «Миксоспоридии фауны СССР» (М.-Л.: Наука, 1966. 507 с.), и мне было более чем приятно, когда, вручая мне эту книгу как подарок, Соломон Самуилович написал на ее титульном листе «Дорогому Эрику на добрую память от автора. 5/VIII 1966 г.».

Участниками экспедиции по большим озерам Карелии помимо ее руководителя Соломона Самуиловича Шульмана были практикант из Кореи Чан Сын Ман, временный лаборант Валерия Николаевна Берениус (Лера, как ее

все называли), временный лаборант Ю. Л. Захарова, практикантка из Ленинградского педагогического института им. Герцена, временный лаборант Галя Окунева (ставшая затем кандидатом биологических наук), практикантка с кафедры зоологии беспозвоночных биофака ЛГУ Лилия Винниченко (позднее также кандидат биологических наук), автор этих строк, водитель моторной лодки, водитель грузового автомобиля-полупортки А. Н. Сорокин и некоторые другие. Спустя многие годы я изредка встречался лишь с Лилей Винниченко, которая стала сотрудницей Института цитологии АН СССР (затем РАН) и служила под началом Юрия Ивановича Полянского и его ближайших коллег. С Галей Окуновой я неожиданно встретился в 1997 г. на заседании Экологического клуба «Интеграл», руководимого кандидатом педагогических наук Т. В. Корнер – старшим научным сотрудником Института образования взрослых Российской академии образования. Галина Евгеньевна Окунева стала профессиональным педагогом, служила учителем биологии в Речевой школе № 2 и на заседании Экологического клуба «Интеграл» выступила с докладом «Система дидактических материалов как эффективное средство экологического воспитания учащихся (нравственный аспект)».

После окончания экспедиции я начал служить в Ботаническом институте им. В. Л. Комарова АН СССР и продолжал исследования галлообразования и пороков развития у растений. Возбудители этих процессов – особые паразиты растений, и опыт, полученный мной в экспедиции по изучению паразитов рыб, оказался весьма полезен.

В соответствии с задачами экспедиции С. С. Шульмана ее участники должны были осуществлять полное паразитологическое исследование всех рыб, оказавшихся в улове. Такое исследование трудоемко и происходит



Участники экспедиции Лера Берениус (слева), Эрик Слепян и Лилия Винниченко (крайние справа)



Чан Сын Ман, Э. Л. Захарова и С. С. Шульман

по определенной системе, при которой каждый из органов пойманной рыбы, не только внутренних, но и наружных, должен быть тщательно обследован. Программа такого обследования, ее последовательность и преемственность детально описаны Ириной Евгеньевной Быховской-Павловской в ее методическом пособии «Паразитологическое исследование рыб», опубликованном как 19-й выпуск серии «В помощь работающим на полезащитных лесных полосах и на Великих стройках коммунизма» (М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1952. 64 с.) под главной редакцией академика Е. Н. Павловского с редактором выпуска А. С. Мончадским и членами редакционной коллегии – соредакторами А. И. Ивановым, О. Л. Крыжановским и А. А. Стрелковым.

Полагаю абсолютно необходимым специально подчеркнуть великолепный моральный, духовный настрой в коллективе экспедиции. Все трудились без учета времени. Непременными были взаимная поддержка, дружелюбность, доброжелательность. Оказание помощи друг другу, при появлении такой необходимости, и в разборке улова, и при паразитологическом вскрытии рассматривалось как обычная норма. Очень часто, если в общей беседе упоминалась Рахиль Ефремовна, Соломон Самуилович с гордостью говорил, что ему досталась очень хорошая жена, и это также подарок Патрона, поскольку она его ученица.

Последний раз с Соломоном Самуиловичем Шульманом мне посчастливилось встретиться в городе Тольятти, когда он был сотрудником члена-корреспондента АН СССР, профессора Геннадия Самуиловича Розенберга, директора Института экологии Волжского бассейна РАН. Соломон Самуилович совместно с З. С. Донец

и А. А. Ковалевой в это время выпускал из печати свою последнюю монографию «Класс миксоспоридий (Myxosporaea) мировой фауны. Т. I. Общая часть» (СПб.: Наука, 1997. 567 с.).

На память об экспедиции у меня сохранились не только воспоминания. От Соломона Самуиловича я получил в подарок замечательную и редчайшую книгу – Труды Ленинградского общества по изучению местного края, т. 1 (изданную в Ленинграде в 1927 году под редакцией председателя общества профессора Бориса Алексеевича Федченко, сына великих отечественных путешественников – члена-корреспондента Российской академии наук ботаника Ольги Александровны Федченко и зоолога-паразитолога Алексея Павловича Федченко). К слову сказать, с Борисом Алексеевичем Федченко был я знаком. Будучи учеником шестого класса, много раз посещал я его в принадлежащей ему квартире в так называемом Доме ботаников, находившемся в парке Ботанического сада. Бережно храню подаренную им книгу «Материал для флоры Дальнего Востока» (С-Петербург, 1912, 267 с.) с надписью «Моему молодому другу Эрику Слепяну на добрую память от автора». От Рахили Ефремовны и Соломона Самуиловича я получил в подарок также добротню сделанную книжную полку длиной два метра и высотой почти 1,75 метра, которая долгое время служила мне по своему назначению. В Петрозаводске я приобрел в академическом магазине недостающий мне том Собрания сочинений А. Н. Северцова и Академическое собрание сочинений И. И. Мечникова в шестнадцати томах, что было большой редкостью и очень меня обрадовало.

Изложенное – все, что сохранила моя память о двух чудесных людях – ученике и ученице Валентина Александровича Догеля Соломоне Самуиловиче Шульмане (Соме, как его именовали все, кому он был близок и дорог) и Рахили Ефремовне Шульман-Альбовой. Никогда не забуду посещения их квартиры на набережной Невы в так называемом Доме академиков (7-я линия Васильевского острова, дом 2/1, квартира 27), где царили гостеприимство и благожелательность, доброта и остроумие, высокие интеллектуальность и интеллигентность.

*Э. И. Слепян,
академик РАН,
д. б. н., профессор*

УТРАТЫ

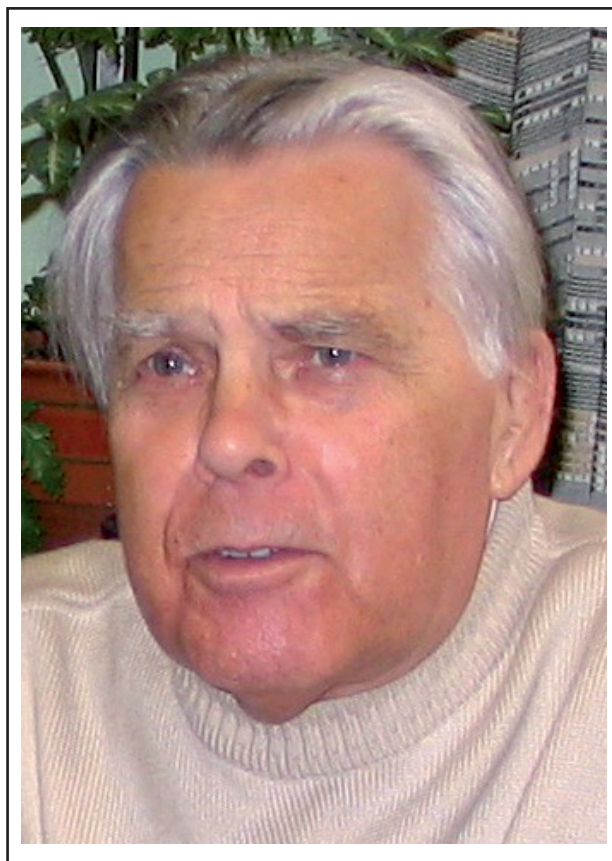
ПАУЛИ ОННИЕВИЧ РИПАТТИ (1933–2015 гг.)

19 июня 2015 г. ушел из жизни ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН кандидат биологических наук Паули Онниевиц Рипатти. Ушел наш коллега, светлый человек, вся биография которого связана с наукой. Он преданно служил ей всю жизнь, и в периоды ее подъема, и в трудные периоды выживания, честно выполняя свое дело, отдавая этому все силы. В этом безоговорочном служении науке он был примером настоящего Ученого.

П. О. Рипатти родился 29 марта 1933 г. в Петрозаводске в семье учителей. Во время Великой Отечественной войны вместе с семьей был в эвакуации в Пермской, а затем в Вологодской области (г. Череповец). Отец его служил в это время в рядах Советской Армии; после демобилизации отца (1946 г.) семья вернулась в Петрозаводск. В 1950 г. П. О. Рипатти окончил здесь среднюю школу.

Со школьных времен было ясно, что у него большие способности к точным наукам. Кроме того, он увлекался шахматами и достигал в них заметных успехов. Интересно, что в 1949 г. 16-летний школьник Паули Рипатти выступал в юношеском первенстве по шахматам в Риге и сыграл там партию с будущим гроссмейстером и чемпионом мира, а тогда просто членом команды Латвии 13-летним школьником Михаилом Талем; партия Таль – Рипатти закончилась вничью (<http://test-saiting3.narod.ru/r4aa1.html>). Любовь к шахматам П. О. Рипатти пронес через всю свою жизнь.

В 1950 г. П. О. Рипатти поступил, а в 1955 г. с отличием окончил физико-математический факультет Карело-Финского государственного



университета по специальности «физика». Несомненные способности выпускника и его увлеченность наукой не остались незамеченными, и П. О. Рипатти был оставлен в университете. Работал старшим лаборантом, а потом ассистентом кафедры физики. В 1957 году он успешно сдал экзамены в аспирантуру физического факультета Ленинградского государственного

университета им. А. А. Жданова и стал аспирантом кафедры оптики, которую возглавлял крупный советский физик и организатор науки, чл.-корр. АН СССР С. Э. Фриш. Паули Онниевичу повезло на учителей в науке: он непосредственно работал с известным физиком д. ф.-м. н. Ю. М. Каганом (https://ru.wikipedia.org/wiki/Каган,_Юрий_Максимович) и В. И. Перелем; последний в будущем стал академиком РАН и руководителем теоретического отдела Физико-технического института имени А. Ф. Иоффе (https://ru.wikipedia.org/wiki/Перель,_Владимир_Иделевич). Первая в списке работ П. О. Рипатти – это статья в соавторстве с ними в «Вестнике Ленинградского государственного университета» по атомной спектроскопии о методе определения параметров плазмы газового разряда с помощью зондов.

После окончания аспирантуры в 1960 г. П. О. Рипатти вернулся в Петрозаводск и работал ассистентом кафедры общей физики Петрозаводского государственного университета, но летом 1961 г. принял решение перейти на работу в лабораторию биохимии липидов Института биологии Карельского филиала АН СССР, которую возглавлял к. б. н. Б. П. Смирнов. С тех пор П. О. Рипатти не менял места работы (названия иногда менялись лишь вследствие структурных реорганизаций, проводимых в институте или в академии наук), и он прошел все ступеньки: инженера, младшего научного сотрудника, старшего научного сотрудника, ведущего научного сотрудника, руководителя группы.

С первых же дней работы в институте П. О. Рипатти проявил себя как инициативный, творческий, трудолюбивый сотрудник, безукоризненно, добросовестно и ответственно относящийся к своим обязанностям и всем поручениям. Его физико-математическое образование очень помогало в решении разнообразных биологических задач. Он сразу же занялся созданием прибора для получения поляризованного ультрафиолетового света, что было в тот момент крайне необходимо для проведения работ лаборатории биохимии липидов по разделу «Разработка метода разделения и анализа оптически активных изомеров биологически активных соединений». Позже на один из методов (способ количественного анализа смесей желчных кислот) было получено авторское свидетельство. П. О. Рипатти приложил немало усилий в организации работы оптического кабинета, а затем в течение всех лет постоянно и активно участвовал в разработке, совершенствовании и применении разных физических методов для биохимических и медицинских

исследований (спектрофотометрия, спектроскопия, газо-жидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография).

Наряду с развитием физических методов как таковых он проводил всесторонние исследования по сравнительной биохимии желчных кислот, выявлению путей их эволюции, во взаимосвязи с характером питания живого организма. В апреле 1975 г. на основе полученных результатов он успешно защитил диссертацию «Биологическая специфичность желчных кислот» на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Его глубокие знания уже тогда вызывали уважение коллег-биологов, которые имели возможность обсудить с ним проблемные научные вопросы или получить методическую консультацию.

Круг научных интересов П. О. Рипатти со временем неизменно расширялся: биохимия липидов, молекулярная биофизика, биомембраны, хроматография и автоматическая обработка хроматографической информации. Совместно с коллегами он выполнял большой комплекс исследований, который можно охарактеризовать как поиск и установление связей между физико-химическими свойствами биологически важных молекул и их функциями в организме. Была проанализирована связь между характером питания животных и составом их желчных солей в зависимости от амфифильных свойств молекул желчных кислот; показана возможность контроля биологического состояния водоемов по изменениям состава желчных кислот в желчи рыб. Был исследован состав остатков жирных кислот липидов в органах и тканях различных групп животных (нематод, клещей, моллюсков, рыб и др.). П. О. Рипатти активно участвовал в работах по изучению свойств цепей жирных кислот разной степени ненасыщенности в свободном состоянии и в липидных слоях методами компьютерного имитационного моделирования. У него более 290 научных трудов, в том числе более 60 статей в ведущих российских и зарубежных журналах, более 70 статей в сборниках, три главы в книгах. В список журналов входят Доклады Академии наук, Известия РАН, Успехи современной биологии, Биологические мембраны, Журнал эволюционной биохимии и физиологии, Онтогенез, Микология и фитопатология, Паразитология, Прикладная биохимия и микробиология, Вопросы ихтиологии, Вопросы медицинской химии, Зоологический журнал, Физиология растений, Сельскохозяйственная биология, Высокомолекулярные соединения, Биофизика, Журнал физической

химии, *Biochimica et Biophysica Acta*, *Chemistry and Physics of Lipids*, *Proceedings of SPIE*, *Journal of Biological Physics*, *Physical Review*, *Polar Biology*, *International Journal of Molecular Sciences* и др. Даже перечисление их названий свидетельствует об очень высоком уровне работ П. О. Рипатти и широком круге рассмотренных вопросов.

П. О. Рипатти проработал в Институте биологии 54 года из 60 лет общего трудового стажа. Он был членом Ученого совета ИБ КарНЦ РАН, входил в состав диссертационного совета при Карельской государственной педагогической академии по защите кандидатских диссертаций по биологическим наукам по специальности 03.00.04 – биохимия, был членом спортсовета КФ АН СССР, активным членом общества «Знание». С введением в начале 90-х годов грантовой системы П. О. Рипатти с энтузиазмом включился в разработку и выполнение инициативных проектов. Это прекрасная иллюстрация того факта, что для талантливого ученого возраст – не помеха. Он был руководителем проектов РФФИ в 1997–1999, 2001–2003 годах; одним из исполнителей проектов РФФИ в 1995–1997, 2000–2002, 2003–2005, 2006–2008, 2010–2012 годах; участником работ по грантам Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-894.2003.4, НШ-4310.2006.4, НШ-306.2008.4, НШ-3731.2010.4, НШ-1642.2012.4; участником работ по грантам ФЦП и госбюджетным темам, программам фундаментальных исследований ОБН РАН и Президиума РАН.

П. О. Рипатти занесен в Книгу Почета ИБ КарНЦ РАН, имеет почетную грамоту Президиума АН СССР, две почетные грамоты РАН и профсоюза работников РАН, грамоту Совета Министров КАССР, две грамоты КФ АН СССР и пять грамот КарНЦ РАН, медаль «Ветеран труда». За высокие достижения в научно-исследовательской работе он многократно получал благодарности и премии. Но жажды наград или иных формальных признаков признания у него не было и в помине, главным его удовольствием было постоянное участие в творческом научном процессе: погружение в проблему, анализ получаемых результатов, постановка новых задач, осознание закономерностей изучаемых явлений. В этом он был всегда собран и требователен к себе. Это прекрасно знали и чувствовали окружающие, и это вызывало искреннее уважение.

И была еще одна причина всеобщего уважения и притягательности П. О. Рипатти – его замечательные человеческие качества, и прежде всего – неизменно теплое, доброжелательное, внимательное отношение к людям. Здесь он

был просто образцом. Он был всегда открыт, к нему можно было обратиться ежедневно (или ежечасно) по любому вопросу. Многие стремились обсудить с ним свои результаты, услышать его мнение. Его оценка всегда была важна для коллег, поскольку она была взвешенная, глубокая, чему способствовал его широкий научный кругозор. К нему часто обращались за советами и при постановке новых задач. Как увлеченный человек, он очень уважал это качество в других и всем безотказно помогал. Например, он помог наладить исследования в области лизосомальных протеиназ; оказал помощь в исследованиях роли липидов и жирных кислот в биохимических адаптациях арктических гидробионтов: его конструктивные советы позволили успешно развернуть эти работы, продуктивно их выполнить и сформировать дальнейшее направление исследований. Паули Онниевич был искренне расположен к любому собеседнику, заинтересованно вникал в проблему, стремился помочь найти пути решения обсуждаемой задачи или возможные ответы на поставленные вопросы; накопленным опытом и идеями он делился щедро.

Отдельно нужно сказать о наставнической деятельности Паули Онниевича, поскольку обучению молодых аспирантов, студентов, которые приходили в лабораторию и только начинали осваивать разные методы исследования, интерпретации результатов, он отдавал много сил и времени. Деятельность его была многогранна: он не только терпеливо, скрупулезно обучал их всем тонкостям на первых шагах, но обычно продолжал «сопровождать», консультировать при подготовке и написании дипломных и диссертационных работ. Это его неравнодушие вызывало у них ответственное чувство искренней, безграничной благодарности, стимулировало их активнее приобщаться к процессу научного исследования и в итоге способствовало профессиональному росту молодых сотрудников. С ним рядом хотелось работать и не отставать на достигнутом: искать, обсуждать, совершенствоваться.

Паули Онниевич был глубоко эрудированным человеком во многих вопросах и помимо науки. Настоящим увлечением всей его жизни оставались шахматы: он следил за шахматной литературой, участвовал в турнирах КФ АН СССР. Много лет увлекался филателией. Он очень любил читать (даже не читать, а изучать!) книги по истории России и других стран, знал литературу, с удовольствием участвовал в дискуссиях на разные темы, обладал тонким вкусом, отлично понимал юмор. Он заботился

о семье и родных, был хорошим отцом своему сыну и дочери и дедом – своим внукам.

Ушел из жизни ученый, который знал настоящую цену жизни, людям и поступкам. Он всегда оставался собой, не придавал значения житейским мелочам, был глубоким, образованным, интеллигентным человеком. Радовался чужим успехам, умел поддерживать в трудную минуту точным словом, сопережи-

вать и успокаивать. Он был верным товарищем и не умел предавать...

Достойный человек прожил достойную жизнь. Мы никогда его не забудем.

*Сотрудники лаборатории
экологической биохимии
Института биологии
Карельского научного центра РАН*

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

(требования к работам, представляемым к публикации
в «Трудах Карельского научного центра Российской академии наук», с 2015 г.)

«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 её 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 опубликованием авторам высылаются распечатанная версия статьи, которая вычитывается, подписывается авторами и возвращается в редакцию.

Журнал имеет полноценную электронную версию на базе Open Journal System (OJS), позволяющую перевести предоставление и редактирование рукописи, общение автора с редколлегиями серий и рецензентами в электронный формат и обеспечивающую прозрачность процесса рецензирования при сохранении анонимности рецензентов (<http://journals.krc.karelia.ru/>).

Редакционный совет журнала «Труды Карельского научного центра РАН» (Труды КарНЦ РАН) определил для себя в качестве одного из приоритетов полную открытость издания. Это означает, что пользователям на условиях свободного доступа разрешается: читать, скачивать, копировать, распространять, печатать, искать или находить полные тексты статей журнала по ссылке без предварительного разрешения от издателя и автора. Учредители журнала берут на себя все расходы по редакционно-издательской подготовке статей и их опубликованию.

Содержание номеров Трудов КарНЦ РАН, аннотации и полнотекстовые электронные варианты статей, а также другая полезная информация, включая настоящие Правила, доступны на сайтах – <http://transactions.krc.karelia.ru>; <http://journals.krc.karelia.ru>

Почтовый адрес редакции: 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11, КарНЦ РАН, редакция Трудов КарНЦ РАН. Телефон: (8142) 762018.

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 большего 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 на сайте <http://journals.krc.karelia.ru> либо на e-mail: trudy@krc.karelia.ru, или же представляются в редакцию лично (г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11, каб. 502). К рукописи желательно прилагать два бумажных 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 – места работы каждого автора в именительном падеже на русском языке курсивом (если авторов несколько и работают они в разных учреждениях, 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 (статья экспериментального характера, как правило, должны иметь разделы: **Введение. Материалы и методы. Результаты и обсуждение. Выводы** либо **Заключение**); благодарности и указание источников финансирования выполненных исследований; списки литературы: с библиографическими описаниями на языке и алфавите оригинала (**Литература**) и транслитерированный в латиницу с переводом русскоязычных источников на английский язык (**References**); 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, научные звания, ученые степени 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 состоять из 8–10 значимых слов.

АННОТАЦИЯ** должна быть лишена вводных фраз, создавать возможно полное представление о содержании статьи и иметь объем не менее 200 слов. Рукопись с недостаточно раскрывающей содержание аннотацией может быть отклонена.

Отдельной строкой приводится перечень КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ (не менее 5). Ключевые слова или словосочетания отделяются друг от друга точкой с запятой, в конце фразы ставится точка. Слова, фигурирующие в заголовке статьи, ключевыми являться не могут.

Раздел «Материалы и методы» должен 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 в разделе «Заключение» 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) либо начальным словом описания источника, приведенного в списке литературы, и заключаются в квадратные скобки. При перечислении нескольких источников работы располагаются в хронологическом порядке, например: [Иванов, Топоров, 1965; Успенский, 1982; Erwin et al., 1989; Атлас..., 1994; Longman, 2001].

ТАБЛИЦЫ нумеруются в порядке упоминания их в тексте, каждая таблица имеет свой заголовок. На полях бумажного экземпляра 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, поясняются 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 рисунки вставляются в общий текстовый файл. При сдаче материала, принятого в печать, все рисунки из текста статьи должны быть убраны и представлены в виде отдельных файлов в вышеуказанном формате. Графические материалы должны быть снабжены распечатками с указа-

* Названия видов приводятся на латинском языке КУРСИВОМ, в скобках указываются высшие таксоны (семейства), к которым относятся объекты исследования.

** Обращаем внимание авторов, что в связи с подготовкой журнала к включению в международные базы данных библиографических описаний и научного цитирования расширенная аннотация на английском языке, а также транслитерированный в латиницу список использованной литературы приобретают особое значение.

нием 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 groenlandicits* (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.

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.

ТРАНСЛИТЕРИРОВАННЫЙ СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (References). Приводится отдельным списком, повторяя все позиции основного списка литературы. Описания русскоязычных работ указываются в латинской транслитерации, рядом в квадратных скобках помещается их перевод на английский язык. Выходные данные приводятся на английском языке (допускается транслитерация названия издательства). При наличии переводной версии источника можно указать ее библиографическое описание. Описания прочих работ приводятся на языке оригинала. Для составления списка рекомендуется использование бесплатной программы транслитерации на сайте <http://translit.ru/>, вариант VCI.

Внимание! С 2015 года каждой статье, публикуемой в «Трудах Карельского научного центра РАН», редакцией присваивается уникальный идентификационный номер цифрового объекта (DOI) и статья включается в базу данных CrossRef. **Обязательным условием является указание в списках литературы DOI для тех работ, у которых он есть.**

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

¹Институт 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. Снатцке. М.: Мир, 1970. С. 348–350.

Патрушев Л. И. Экспрессия генов. М.: Наука, 2000. 830 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.

B References:

Vol'f G. N. Dispersiya opticheskogo vrashheniya i krugovoj dikhroizm v organicheskoy khimii [Optical rotatory dispersion and circular dichroism in Organic Chemistry]. Ed. G. Snattske. Moscow: Mir, 1970. P. 348–350.

Patrushev L. I. Ekspressiya genov [Gene expression]. Moscow: Nauka, 2000. 830 p.

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, No 4. P. 507–516.

Noctor G., Queval G., Mhamdi A., Chaouch A., Foyer C. H. Glutathione // Arabidopsis Book. American Society of plant Biologists, Rockville, MD. 2011. doi:10.1199/tab.0142.

B References:

Viktorov G. A. Mezvidovaya konkurentsiya i sosushhestvovanie ehkologicheskikh gomologov u paraziticheskikh pereponchatokrylykh [Interspecific competition and coexistence ecological homologues in parasitic Hymenoptera]. Zhurn. obshh. biol. 1970. Vol. 31, No 2. P. 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, No 4. P. 507–516.

Noctor G., Queval G., Mhamdi A., Chaouch A., Foyer C. H. Glutathione. Arabidopsis Book. American Society of plant Biologists, Rockville, MD. 2011. doi:10.1199/tab.0142.

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.

B References:

Mar'inskikh D. M. Razrabotka landshaftnogo plana kak neobkhodimoe uslovie ustoichivogo razvitiya goroda (na primere Tyumeni) [Landscape planning as a necessary condition for sustainable development of a city (example of Tyumen)]. *Ekologiya landshafta i planirovanie zemlepol'zovaniya: tezisy dokl. Vseros. konf. (Irkutsk, 11–12 sent. 2000 g.)* [Landscape ecology and land-use planning: abstracts of all-Russian conference (Irkutsk, Sept. 11–12, 2000)]. Novosibirsk, 2000. P. 125–128.

Ссылки на диссертации или авторефераты диссертаций

Шефтель Б. И. Экологические аспекты пространственно-временных межвидовых взаимоотношений землероек Средней Сибири: дис. ... канд. биол. наук. М., 1985. С. 21–46.

B References:

Sheftel' B. I. *Ekologicheskie aspekty prostranstvenno-vremennykh mezhhvidovykh vzaimootnoshenii zemlerоек Srednei Sibiri* [Ecological aspects of spatio-temporal interspecies relations of shrews of Middle Siberia]: PhD Diss. (Biol.). Moscow, 1985. P. 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.

B References:

Patent RF № 2000130511/28. 04.12.2000 [Russian patent No 2000130511/28. December 4, 2000].

Es'kov D. N., Seregin A. G. *Optiko-elektronnyi apparat* [Optoelectronic apparatus]. Patent Rossii № 2122745 [Russian patent No 2122745]. 1998. Bulletin No 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.

B References:

Grebenshchikov Ya. P. *K nebol'shomu kursu po bibliografii: materialy i zametki, 26 fevr. – 10 marta 1924 g.* [Brief course on bibliography: the materials and notes, Febr. 26 – March 10, 1924]. OR RNB. F. 41. St. un. 45. L. 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).

Демография. Официальная статистика / Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс]. URL: <http://www.gks.ru/> (дата обращения: 25.12.2015).

B References:

Parinov S. I., Lyapunov V. M., Puzyrev R. L. *Sistema Sotsionet kak platforma dlya razrabotki nauchnykh informatsionnykh resursov i onlainovykh servisov* [Socionet as a platform for development of scientific information resources and online services]. *Elektron. b-ki [Digital library]*. 2003. Vol. 6, iss. 1. URL: <http://www.elbib.ru/index.phtml?page=elbib/rus/journal/2003/part1/PLP/> (accessed: 25.11.2006).

Demografiya. *Oficial'naja statistika* [Demography. Official statistics]. *Federal'naja sluzhba gosudarstvennoj statistiki* [Federal state statistics service]. URL: <http://www.gks.ru/> (accessed: 25.12.2015).

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.

B References:

Gosudarstvennaya Duma, 1999–2003 [State Duma, 1999–2003]. Electronic encyclopedia. The office of the State Duma of the Federal Assembly of the Russian Federation. Moscow, 2004. 1 CD-ROM.

TABLE OF CONTENTS

REVIEWS

L. P. Smirnov, E. V. Borvinskaya, I. V. Sukhovskaya, A. A. Kochneva. GLUTATHIONE S-TRANSFERASES IN HELMINTHS	3
--	---

ORIGINAL PAPERS

E. A. Khizhkin, E. P. Antonova, V. A. Ilyukha, L. B. Uzenbaeva, T. N. Ilyina, I. V. Baishnikova, V. V. Belkin, D. V. Shvedov. AGE-RELATED CHANGES OF PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RODENTS WITH DIFFERENT ECOLOGICAL SPECIALIZATIONS	15
--	----

A. A. Fenko, N. S. Repkina, V. V. Talanova. SALICYLIC ACID EFFECT ON THE COLD TOLERANCE OF CUCUMBER SEEDLINGS	26
---	----

L. L. Novitskaya, N. A. Galibina, K. M. Nikerova. SUGAR TRANSPORT AND STORAGE IN THE PHLOEM OF <i>BETULA PENDULA</i> ROTH VAR. <i>PENDULA</i> AND VAR. <i>CARELICA</i>	35
--	----

N. A. Sidorova, E. A. Zatsarinnaya. ASSESSMENT OF AUXOTROPHIC <i>ESCHERICHIA COLI</i> OCCURRENCE IN SOME KARELIAN RESERVOIRS	48
--	----

O. Yu. Bespyatykh, N. V. Pronina, O. N. Sukhikh, A. E. Kokorina. STIMULATION OF REPRODUCTIVE FUNCTION IN FEMALE AND MALE FUR ANIMALS	56
--	----

H. G. Ionkina, A. V. Kolchin. ACQUISITION OF THE ELECTRICAL ACTIVITY OF RAT CEREBRAL CORTEX	62
---	----

N. S. Repkina, Yu. V. Batova, A. F. Titov, V. V. Talanova. GLUTATHIONE SYNTHETASE (<i>GS3</i>) GENE EXPRESSION IN THE LEAVES AND ROOTS OF WHEAT SEEDLINGS UNDER CADMIUM IMPACT	67
--	----

N. N. Fokina, T. R. Ruokolainen, N. N. Nemova, I. N. Bakhmet. ALTERATION OF THE LIPID COMPOSITION IN BLUE MUSSELS, <i>MYTILUS EDULIS</i> L., AS A RESULT OF THEIR ACCLIMATION TO LABORATORY CONDITIONS	76
--	----

N. N. Nemova, M. Yu. Krupnova, D. A. Efremov, A. E. Veselov. THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEASES (CATHEPSINS B AND D) IN THE MUSCLES OF JUVENILE (0+, 1+, 2+) ATLANTIC SALMON FROM THE VARZUGA RIVER	85
--	----

E. A. Vdovichenko, R. U. Vysotskaya, D. A. Efremov, A. E. Veselov. THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL NUCLEASES IN DIFFERENT AGE GROUPS OF SALMON, <i>SALMO SALAR</i> L.	92
---	----

O. B. Vasil'eva, M. A. Nazarova, P. O. Ripatti, N. N. Nemova. EFFECT OF DIFFERENT DIETS ON GROWTH PERFORMANCE IN RAINBOW TROUT, <i>PARASALMO MYKISS</i> (WALBAUM, 1792)	99
---	----

L. V. Topchieva, I. V. Kurbatova, I. E. Malysheva, V. A. Korneva, O. Yu. Barysheva, O. P. Dudanova. THE LIPID PROFILE IN HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH DIFFERENT GENOTYPES OF THE -308G>A POLYMORPHIC MARKER OF THE <i>TNF</i> GENE	109
--	-----

MEMORIES

E. I. Slepyan. I have never forgotten Solomon Samuilovich Shul'man – one of my first scientific supervisors	120
---	-----

BEREAVEMENTS

Pauli O. Ripatti (1933–2015) 124

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS 128

Научное издание

**Труды Карельского научного центра
Российской академии наук**
№ 11, 2015

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 Г. О. Предтеченский

Подписано в печать 26.11.2015. Формат 60x84¹/₈.
Гарнитура Pragmatica. Печать офсетная. Уч.-изд. л. 14,6. Усл. печ. л. 15,8.
Тираж 500 экз. Заказ 327

Карельский научный центр РАН
Редакционно-издательский отдел
185003, г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50