

Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр
Российской академии наук»

ТРУДЫ

КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

№ 12, 2018

Серия ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Петрозаводск
2018

Главный редактор

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

Редакционный совет

А. М. АСХАБОВ, академик РАН, д. г.-м. н., проф.; О. Н. БАХМЕТ (зам. главного редактора), член-корр. РАН, д. б. н.; А. В. ВОРОНИН, д. т. н., проф.; И. В. ДРОБЫШЕВ, доктор биологии (Швеция – Канада); Э. В. ИВАНТЕР, член-корр. РАН, д. б. н., проф.; Х. ЙООСТЕН, доктор биологии, проф. (Германия); А. С. ИСАЕВ, академик РАН, д. б. н., проф.; А. М. КРЫШЕНЬ, д. б. н.; Е. В. КУДРЯШОВА, д. флс. н., проф.; О. Л. КУЗНЕЦОВ, д. б. н.; В. В. МАЗАЛОВ, д. ф.-м. н., проф.; Н. Н. НЕМОВА, член-корр. РАН, д. б. н., проф.; О. ОВАСКАЙНЕН, доктор математики, проф. (Финляндия); О. Н. ПУГАЧЕВ, академик РАН, д. б. н.; С. А. СУББОТИН, доктор биологии (США); Д. А. СУБЕТТО, д. г. н.; Н. Н. ФИЛАТОВ, член-корр. РАН, д. г. н., проф.; Т. Э. ХАНГ, доктор географии (Эстония); П. ХЁЛЬТТЯ, доктор геологии, проф. (Финляндия); К. ШАЕВСКИЙ, доктор математики, проф. (Польша); 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.; O. N. BAKHMET (Deputy Editor-in-Chief), RAS Corr. Fellow, DSc (Biol.); I. V. DROBYSHEV, PhD (Biol.) (Sweden – Canada); N. N. FILATOV, RAS Corr. Fellow, DSc (Geog.), Prof.; T. E. HANG, PhD (Geog.) (Estonia); P. HÖLTTÄ, PhD (Geol.), Prof. (Finland); A. S. ISAEV, RAS Academician, DSc (Biol.), Prof.; E. V. IVANTER, RAS Corr. Fellow, DSc (Biol.), Prof.; H. JOOSTEN, Dr. (Biol.), Prof. (Germany); A. M. KRYSHEN', DSc (Biol.); E. V. KUDRYASHOVA, DSc (Phil.), Prof.; O. L. KUZNETSOV, DSc (Biol.); V. V. MAZALOV, DSc (Phys.-Math.), Prof.; N. N. NEMOVA, RAS Corr. Fellow, DSc (Biol.), Prof.; O. OVASKAINEN, PhD (Math.), Prof. (Finland); O. N. PUGACHYOV, RAS Academician, DSc (Biol.); V. V. SHCHIPTSOV, DSc (Geol.-Miner.), Prof.; S. A. SUBBOTIN, PhD (Biol.) (USA); D. A. SUBETTO, DSc (Geog.); K. SZAJEWSKI, PhD (Math.), Prof. (Poland); A. V. VORONIN, DSc (Tech.), Prof.

Редакционная коллегия серии «ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ»

А. М. АНДРЕЕВА, д. б. н.; Т. О. ВОЛКОВА, д. б. н.; А. С. ГОРЮНОВ, к. ф.-м. н., доцент; В. А. ИЛЮХА (зам. отв. редактора), д. б. н., доцент; Н. М. КАЛИНКИНА, д. б. н.; О. Н. ЛЕБЕДЕВА, к. б. н., доцент; Е. М. МАТВЕЕВА, к. б. н.; А. Ю. МЕЙГАЛ, д. м. н., проф.; Н. Н. НЕМОВА (отв. редактор), чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.; 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.; Н. П. ШАРОВА, д. б. н.

Editorial Board of the Experimental Biology Series

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

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

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>

© ФИЦ «Карельский научный центр РАН», 2018

© Институт биологии КарНЦ РАН, 2018

© Институт леса КарНЦ РАН, 2018

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 57.053:577. 112.7:577.112.8

3. БЕЛКИ-ТРАНСПОРТЕРЫ ОРГАНИЧЕСКИХ КАТИОНОВ СЕМЕЙСТВА SLC22 (ОСТ-ОСТN). МОЛЕКУЛЯРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ, СТРУКТУРА, ФУНКЦИЯ, УЧАСТИЕ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ СИСТЕМЫ МЕЖОРГАННОЙ КОММУНИКАЦИИ У ЖИВОТНЫХ (ОБЗОР)

Л. П. Смирнов

*Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН»,
Петрозаводск, Россия*

В состав семейства SLC22 кроме транспортеров органических анионов (ОАТ) включены транспортеры органических катионов (ОСТ) и карнитин/цвиттер-ионов (ОСТN). К настоящему времени идентифицировано три транспортера органических катионов ОСТ1, 2, 3, а также три транспортера карнитин/цвиттер-ионов ОСТ6, ОСТN1 и ОСТN2. Субстраты ОСТ – это структурно разнообразные экзогенные соединения, в том числе лекарственные препараты и токсины, а также ряд эндогенных веществ. Для ОСТ характерно очень широкое тканевое распределение. Они состоят из 543–557 аминокислот, которые формируют 12 трансмембранных спиралей (доменов). Эти домены организованы как N- и C-концевые упаковки из 6 спиралей. Большая внеклеточная петля между первым и вторым доменами (110 аминокислотных остатков) содержит три сайта N-гликозилирования и шесть консервативных остатков цистеина. Большая внутриклеточная петля, связывающая спирали 6 и 7, имеет множественные сайты фосфорилирования, медиаторами которого выступают протеинкиназы А, С, G, казеинкиназа 2. Некоторые особенности являются уникальными для сочленов семейства SLC22, например, специфическая последовательность [-Сер/Тре]-Иле-Вал-Тре-Глу-[Фен/Три]-[Асп/Асн]-Лей-Вал-Цис- перед спиралью 2. ОСТ1 и ОСТ2 сходны на 70 % по аминокислотному составу и примерно на 50 % с ОСТ3. Согласно гипотезе межорганной коммуникации транспортеры ОСТ, ОСТN и ABC (ATP-binding cassette), экспрессируемые в барьерном эпителии, служащем интерфейсом для жидких компартментов в органах, таких как мозг, глаза, уши, печень и почки, совместно участвуют в обработке большого числа разнообразных соединений.

Ключевые слова: ОСТ; ОСТN; переносчики органических катионов; субстратная специфика; межорганная коммуникация.

L. P. Smirnov. ORGANIC CATION TRANSPORTERS OF THE SLC22 FAMILY. MOLECULAR DIVERSITY, STRUCTURE, FUNCTION, PARTNERSHIP IN THE FUNCTIONING OF THE INTERORGAN COMMUNICATION SYSTEM OF ANIMALS (A REVIEW)

Organic cation/zwitterions transporters (OCT-OCTN) of the SLC22 family share many structural characteristics with other MFS proteins and have received a great deal of attention because of their role in the handling of common drugs, toxins, and endogenous substances (neurotransmitters, polyamines). OCTs are expressed in many tissues, including kidney, liver, olfactory mucosa, brain, retina, and placenta. At present, 3 OCTs and 3 OCTNs are known. OCTs may be a part of the evolutionary conservative system that protects higher organisms against potentially toxic compounds in the environment. The polypeptide chain consists of 543–557 amino acid residues. The secondary structure of the molecule is characterized by 12 transmembrane helices and intracellular localization of N- and C-termini of the molecule. The large extracellular loop (110 amino acid residues) between helices 1 and 2 contains 3 sites for N-linked glycosylation and 6 conservative cysteine residues. The second large intracellular loop located between helices 6 and 7 contains consensus sites for protein kinase A, C, G and casein kinase 2. The specific sequence [-Ser/Thr]-Ile-Val-Thr-Glu-[Phe/Trp]-[Asp/Asn]-Leu-Val-Cys- before helix 2 is unique for the SLC family. OCT1 and OCT2 have 70 % similarity in the amino acid composition, and 50 % similarity to OCT3. According to the “Remote Sensing and Signaling Hypothesis”, OCTs (especially OCTNs) may function in remote interorgan communication by regulating the levels of signaling molecules and key metabolites between organs and organ-body fluids.

Keywords: OCT; OCTN; organic cation transporters; substrate specificity; remote sensing and communication.

Введение

В состав суперсемейства вторичных мембраносвязанных переносчиков MFS (Major Facilitator Superfamily) входят белки семейств SLC22 [Смирнов и др., 2017a] и SLC21 (OATP) [Смирнов и др., 2017b], которые осуществляют трансмембранный перенос «органических электролитов» – структурно различных соединений, имеющих отрицательный, положительный либо одновременно оба заряда (цвиттер-ионы) при физиологических значениях pH. К ним относятся эндогенные субстраты, имеющие физиологическое значение, а также фармакологически и токсикологически значимые ксенобиотики [Pelis, Wright, 2014; Saier et al., 2014]. В состав семейства SLC22 кроме транспортеров органических анионов (OAT) включены транспортеры органических катионов (OCT) и карнитин/цвиттер-ионов (OCTN).

В настоящей работе дан анализ современного состояния исследований OCT и OCTN, группы белков, которые составляют примерно от одной трети до половины сочленов семейства SLC22 [Nigam et al., 2015]. Обзор включает информацию по номенклатуре, тканевой, субстратной и структурной специфике, молекулярному разнообразию, функциональным возможностям, а также в дистанционной межорганной коммуникации путем регуляции уровней сигнальных молекул и ключевых метаболитов.

Общие сведения и номенклатура транспортеров органических катионов (OCT) и цвиттер-ионов (OCTN)

В отличие от транспортеров сем. SLC21 (OATP) и транспортеров органических анионов (OAT) молекулярное разнообразие транспортеров органических катионов количественно меньше. К настоящему времени идентифицировано три транспортера органических катионов OCT1, 2, 3 (*SLC22A1*, 2, 3), а также три транспортера карнитин/цвиттер-ионов OCT6 (*SLC22A16*), OCTN1 (*SLC22A4*), OCTN2 (*SLC22A5*) [Koepsell, 2013; Pelis, Wright, 2014] (табл. 1). OCT обозначаются заглавными буквами с соответствующими приставками – h для человека, m – для мыши и т. д. А гены обозначаются курсивом по-разному – у человека заглавными буквами, а у других видов – строчными [Zhu et al., 2015].

Транспорт органических катионов осуществляется OCT независимо от ионов Na⁺ и Cl⁻ [Koepsell et al., 2003; Koepsell, 2011]. Субстратами является большое число структурно не связанных между собой небольших органических катионов эндогенного и экзогенного происхождения, включая множество лекарств [Nies et al., 2011]. OCT1, OCT2 и OCT3 обеспечивают пассивную диффузию большого количества катионов по электрохимическому градиенту [Koepsell, Endou, 2004; Ciarimboli, 2011]. На внутрен-

Таблица 1. Транспортеры органических катионов у человека и мыши [по: Zhu et al., 2015]

Table 1. Cation/zwitterion transporters of human and mice [after: Zhu et al., 2015]

Название гена у человека Human gene symbol	Название транспортера у человека Human protein name	Локализация на хромосоме Human gene locus	Название гена у мыши Mice gene symbol	Название транспортера у мыши Mice protein name	Локализация на хромосоме Mice gene locus
<i>SLC22A1</i>	hOCT1	6q25.3	<i>Slc22a1</i>	mOCT1	17
<i>SLC22A2</i>	hOCT2	6q25.3	<i>Slc22a2</i>	mOCT2	17
<i>SLC22A3</i>	hOCT3	6q25.3	<i>Slc22a3</i>	mOCT3	17
<i>SLC22A4</i>	hOCTN1	5q31.1	<i>Slc22a4</i>	mOCTN1	11
<i>SLC22A5</i>	hOCTN2	5q23.3	<i>Slc22a5</i>	mOCTN1	11
<i>SLC22A16</i>	hOCT6	6q21-q22.1	-	-	-
-	-	-	<i>Slc22a21</i>	Octn3	11

ней поверхности клеток животных существует мембранный потенциал с отрицательным зарядом, который используют OCT для трансмембранного переноса органических катионов [Koepsell, 2004]. Это позволяет OCT аккумулировать внутри клетки соответствующие субстраты в концентрациях существенно более высоких (до 10 раз), чем снаружи [Chien et al., 2016]. Фактически транспорт может осуществляться в любом направлении независимо от присутствия ионов Na^+ или pH. Сродство к субстратам зависит от степени ионизации последних, что приводит к усилению их транспорта при уменьшении значения pH [Barendt, Wright, 2002].

Тканевое распределение

OCT1 характеризуется высоким уровнем экспрессии в печени, где он локализован на синусоидальной мембране гепатоцитов [Nies et al., 2009] (табл. 2). Кроме того, экспрессия OCT1 показана и в других органах: тонком кишечнике, легких, сердце, скелетной мускулатуре, мозге, плаценте, молочной железе, надпочечниках, глазах, жировой ткани и иммунных клетках [Nishimura, Naito, 2005; Koepsell et al., 2007; Zhang et al., 2008; Gilchrist, Alcorn, 2010; Moreno-Navarrete et al., 2011]. В почках человека обнаружены лишь небольшие количества мРНК OCT1, в то время как у крыс, мышей и кроликов отмечен высокий уровень экспрессии [Koepsell et al., 2007]. В почках крыс OCT1 выявлен в базолатеральных мембранах S1 и S2 сегментов проксимальных трубочек [Koepsell et al., 2007], а у человека показана локализация в люминальных мембранах проксимальных и дистальных трубочек [Tzvetkov et al., 2009]. В легких человека OCT1 найден в люминальной мембране эпителиальных клеток бронхов, в мозге – в эндотелиальных клетках микрососудов

[Lin et al., 2010], в глазу – в роговице, радужно-цилиарном теле и гематоцилиарном барьере [Zhang et al., 2008].

OCT2 локализован главным образом в почках на люминальной мембране дистальной части извитых клубочков [Motohashi et al., 2002]. Кроме того, этот протеин обнаружен в тонком кишечнике, легких, плаценте, тимусе, мозге и внутреннем ухе [Koepsell et al., 2003; Ciarimboli et al., 2010]. У человека в мозгу OCT2 найден в сосудистом сплетении, нейронах и люминальной мембране эндотелиальных клеток микрососудов [Koepsell et al., 2003; Lin et al., 2010; Vacq et al., 2011].

OCT3 характеризуется широчайшим распределением по тканям по сравнению с другими OCT. OCT3 экспрессируется в сердце, скелетной мускулатуре, мозге, где он участвует в транспорте нейротрансмиттеров, тонком кишечнике, печени, легких, почках, мочевом пузыре, молочной железе, радужной оболочке, коже, кровеносных сосудах, клетках опухолей [Zhang et al., 2008]. В мозге человека OCT3 обнаружен в нейронах, клетках глии и эпителиальных клетках сосудистого сплетения [Wang et al., 2007]. Этот белок локализован на базолатеральной мембране гепатоцитов [Nies et al., 2009], базолатеральных мембранах плацентарного эпителия [Sata et al., 2005], базальных мембранах трофобластов [Sata et al., 2005], апикальной мембране энтероцитов [Müller et al., 2005] и люминальной мембране эпителия легких [Lips et al., 2005].

OCTN1 обнаружен в почках, тонком и толстом кишечнике [Meier et al., 2007], брыжейке, сердце, скелетной мускулатуре, мозге, молочной железе [Gilchrist, Alcorn, 2010; Lamhonwah et al., 2011], легких [Horvath et al., 2007], тимусе, простате, семенниках, костном мозге, коже [Markova et al., 2009], роговице, радужно-цилиарном теле, гематоретинальном барьере

Таблица 2. Субстратная специфика и тканевое распределение транспортеров OCT/OCTN [по: Koepsell, 2013]
 Table 2. Substrate specificity and tissue distribution of OCT/OCTN transporters [after: Koepsell, 2013]

Белок Protein	Основные эндо- и экзогенные субстраты Main endogenous and exogenous substrates	Тканевое распределение Tissue distribution
OCT1	<u>Эндогенные</u> : путресцин, гистидил-пролил-дикетопиперазин (cyclo (His-Pro)), салсолинол (1-метил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроксихинолин), агматин <u>Препараты</u> : метформин, ацикловир, пентамидин, фураמידин, оксиплатин и др. <u>Токсины</u> : афлатоксин В1, этидиумбромид <u>Endogenous</u> : putrescine, cyclo (His-Pro), salsolinol, agmatine <u>Drugs</u> : metformin, acyclovir, pentamidine, furamide, oxaliplatin, etc. <u>Toxins</u> : aflatoxin B1, ethidiumbromide	Печень, почки, тонкий кишечник, легкие, скелетная мускулатура, мозг (эндотелиальные клетки гемато-энцефального барьера), жировая ткань, иммунные клетки Liver (sinusoidal membrane of hepatocytes), small intestine, kidney, lung, skeletal muscle, brain (endothelial cells of blood – brain barrier), adipose tissue, immune cells
OCT2	<u>Эндогенные</u> : ацетилхолин, дофамин, эpineфрин, норэpineфрин, серотонин, гистамин, путресцин, холин, cyclo (His-Pro), салсолинол <u>Препараты</u> : амантидин, цисплатин и др. <u>Токсины</u> : афлатоксин В1, этидиумбромид, паракват <u>Endogenous</u> : acetylcholine, dopamine, epinephrine, norepinephrine, serotonin, histamine, putrescine, choline, cyclo (His-Pro), salsolinol, <u>Drugs</u> : amantadine, cisplatin, etc. <u>Toxins</u> : aflatoxin B1, ethidiumbromide, paraquat	Почки, тонкий кишечник, легкие, плацента, тимус, мозг (эндотелиальные клетки гемато-энцефального барьера, нейроны), клетки внутреннего уха Kidney (basolateral membrane of proximal tubules), small intestine, lung, placenta, thymus, brain (neurons, blood – brain barrier), inner ear
OCT3	<u>Эндогенные</u> : эpineфрин, норэpineфрин, гистамин, агматин, cyclo (His-Pro), салсолинол <u>Препараты</u> : лидокаин, метформин, оксиплатин, квинидин, этилэфрин <u>Токсины</u> : нет данных <u>Endogenous</u> : epinephrine, norepinephrine, histamine, agmatine, cyclo (His-Pro), salsolinol <u>Drugs</u> : lidocaine, metformin, oxaliplatin, quinidine, etilefrine, etc. <u>Toxins</u> : no information	Сердце, скелетная мускулатура, мозг (нейроны, глиальные клетки, сосудистое сплетение), тонкий кишечник, печень, легкие, почки, мочевой пузырь, молочная железа, кровяные сосуды кожи Heart, skeletal muscle, brain (neurons, glial cells, plexus choroideus), small intestine, liver, lung, kidney, urinary bladder, mammary gland, skin blood vessels
OCTN1	<u>Эндогенные</u> : ацетилхолин, эрготионеин, глицил-бетаин, L-карнитин <u>Препараты</u> : квинидин, верапамил, ипратропиум, митоксантрон, доксорубицин, бетоницин и др. <u>Токсины</u> : нет данных <u>Endogenous</u> : acetylcholine, ergothioneine, glycinebetaine, L-carnitine <u>Drugs</u> : quinidine, verapamil, ipratropium, mitoxantrone, doxorubicine, betonicine, etc. <u>Toxins</u> : no information	Почки, кишечник, брыжейка, сердце, скелетная мускулатура, мозг, молочная железа, тимус, простата, семенники, глаз, сперма, иммунные клетки Kidney, intestine, mesentery, heart, skeletal muscle, brain, mammary gland, thymus, prostate, testis, eye, sperm, immune cells
OCTN2	<u>Эндогенные</u> : L-карнитин, холин <u>Препараты</u> : милдронат, цефалоридин, эметин, верапамил, шпиронолактон, оксиплатин и др. <u>Токсины</u> : нет данных <u>Endogenous</u> : L-carnitine, choline <u>Drugs</u> : mildronate, cephaloridine, emetine, verapamil, spironolactone, oxaliplatin, etc. <u>Toxins</u> : no information	Скелетная мускулатура, почки (апикальная мембрана проксимальных трубочек), простата, легкие, печень, поджелудочная железа, сердце, тонкий кишечник, надпочечники, щитовидная железа Skeletal muscle, kidney (apical membrane of proximal tubules), prostate, lung, pancreas, heart, small intestine, adrenal gland, thyroid gland, liver
OCT6	<u>Эндогенные</u> : L-карнитин, спермидин <u>Препараты</u> : доксорубицин, блеомицин А5 <u>Токсины</u> : нет данных <u>Endogenous</u> : L-carnitine, spermidine <u>Drugs</u> : doxorubicin, bleomycin A5 <u>Toxins</u> : no information	Семенники (клетки Сертоли и семенного протока), почки, лейкоциты, костный мозг Testis (Sertoli cells and epididymal duct-cells), bone marrow, leukocytes, kidney

глаза [Garrett et al., 2008; Zhang et al., 2008], печени плода, воспаленных суставах [Tokuhiro et al., 2003], сперме, иммунных клетках и клетках опухолей [Koepsell et al., 2007; Wang et al., 2007]. У человека OCTN1 локализован в плазматических мембранах, митохондриях, а также в щеточной каемке клеток проксимальных трубочек почек [Koepsell et al., 2007] и люминаль-

ной мембране эпителия дыхательных путей [Horvath et al., 2007]. В сердце человека OCTN1 обнаружен в эндотелиальных клетках капилляров [Iwata et al., 2008]. OCTN1, локализованный на плазматической мембране, в зависимости от переносимого субстрата может функционировать как органический катион/протон-ионообменник, катион-ионообменник, как Na⁺-

зависимый, так и Na^+ -независимый транспортер цвиттер-ионов [Koepsell et al., 2007; Urban et al., 2007].

Экспрессия OСТN2 показана в печени, почках, тонком и толстом кишечнике [Meier et al., 2007], скелетной мускулатуре, легких [Horvath et al., 2007], молочной железе [Gilchrist, Alcorn, 2010], яичниках, сердце [Grube et al., 2006], плаценте, центральной нервной системе, роговице, геморетинальном барьере и радужно-цилиарном теле [Garrett et al., 2008; Koepsell et al., 2007; Zhang et al., 2008]. У человека OСТN2 показан для эпителиальных клеток, клеток скелетной мускулатуры, глиальных клеток, нейронов [Jong et al., 2011], клеток эндотелия в сердце [Grube et al., 2006], макрофагов, лимфоцитов, сперматозоидов [Kobayashi et al., 2007] и раковых клеток [Koepsell et al., 2007; Wang et al., 2012]. Кроме того, молекулы OСТN2 найдены в мембранах щеточной каймы клеток проксимальных трубочек в почках, энтероцитах в тонком кишечнике [Koepsell et al., 2007], апикальных мембранах эпителия дыхательных путей [Horvath et al., 2007], в альвеолярных мембранах протоков молочных желез [Ling, Alcorn, 2008], плазматических мембранах астроцитов [Januszewicz et al., 2009], в сарколемме сердечной мускулатуры [Iwata et al., 2008], апикальных мембранах главных клеток семявыводящих протоков [Cotton et al., 2010]. Представляется вероятным, что в молочной железе OСТN2 важен для транспорта карнитина в молоко, являющееся источником этого соединения для новорожденных [Lamhonwah et al., 2011].

OСТ6 у человека экспрессируется главным образом в семенниках, тем не менее матричная РНК гена *SLC22A16* также обнаружена в сердце, скелетной мускулатуре, почках, печени, плаценте, молочной железе и мозге [Enomoto et al., 2002; Eraly, Nigam, 2002; Kwok et al., 2006; Sato et al., 2007]. Кроме того, этот транспортер был выявлен в печени эмбрионов, клетках гематопоэза, в клетках крови больных лейкемией, при раке эндометрия, эпителиальном раке яичников и в различных клеточных раковых линиях [Gong et al., 2002; Ota et al., 2007; Sato et al., 2007].

OСТN3 обнаружен пока только у мыши, экспрессируется в семенниках и почках и транспортирует карнитин независимо от присутствия катионов Na^+ [Koepsell, Endou, 2004].

Субстратная специфика

Субстраты OСТ – это структурно разнообразные экзогенные соединения (включая некоторые тяжелые металлы) [Schmitt, Koepsell,

2005], а также ряд эндогенных веществ [Nies et al., 2011]. Наличие отрицательного заряда способствует взаимодействию лигандов с OСТ [Barendt, Wright, 2002], тем не менее у некоторых субстратов заряд очень слабый либо отсутствует при физиологических значениях pH, например у ламивудина [Minuesa et al., 2009], что указывает на комплексный характер взаимодействия «субстрат-транспортер». Кинетика связывания с лигандами включает конкурентный, неконкурентный и смешанный тип взаимодействия [Harper, Wright, 2012].

Большинство субстратов OСТ1 – это одновалентные органические катионы, небольшое число двухвалентных катионов, слабых оснований и незаряженных соединений [Koepsell, 2013]. В число субстратов OСТ1 человека входят такие модельные катионы, как TEA (тетраэтиламмоний), MPP (1-метил-4-фенилпиридин), ASP (4-[4-(диметиламино)-стирил]-N-метилпиридин) и DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол), из которых TEA чаще используется OСТ1 и OСТ2, так как не является подходящим субстратом для OСТ3, а MPP обычно используется всех трех транспортеров [Gründemann et al., 1998] (табл. 2). Эндогенными субстратами OСТ1 являются нейромедиаторы гистидил-пролил-дикетопиперазин (cyclo (His-Pro)) и салсинолол [Tachampa et al., 2008], а также агматин (метаболит аргинина) и путресцин [Winter et al., 2011]. Кроме того, OСТ1 человека переносит метформин (антидиабетический препарат), ламивудин, ацикловир, ганцикловир (антивирусные лекарства), пентамидин, фурамидин (противопаразитные препараты), берберин (холекинетик), противораковые препараты оксиплатин, пикоплатин, цис-диамино (пиридин) хлороплатин (II) [Koepsell et al., 2007; Lovejoy et al., 2008; More et al., 2010], возможно иринотекан и паклитаксел [Nies et al., 2010; Gupta et al., 2011]. Субстратами OСТ1 также являются канцерогенные соединения, такие как афлатоксин В1 и этидиумбромид [Nies et al., 2010].

Установлено, что OСТ2, так же как и OСТ1, транспортирует модельные катионы TEA, MPP, ASP, N-1-метилникотинамид и аминогуанидин, субстраты эндогенного происхождения (нейромодуляторы, нейротрансмиттеры, полиамины) [Koepsell et al., 2007; Nies et al., 2010; Winter et al., 2011]. OСТ2 человека переносит ряд лекарственных средств, таких как мемантин и амантадин (болезнь Паркинсона); противораковые препараты оксиплатин, пикоплатин [More et al., 2010], цисплатин [Nies et al., 2010], ифосфамид [Ciarimboli et al., 2011]; антагонисты H2 рецептора гистамина – циметидин, фамотидин, ранитидин; противовирусные лекар-

ства зальцитабин, ламивудин, диуретик амилорид, антидиабетическое средство метформин [Nies et al., 2010]. Показан транспорт афлатоксина В1 (микотоксин), гербицида паракват и этидиумбромид [Nies et al., 2010]. Эксперименты с ОСТ2 крысы и кролика показали, что белок переносит ион цезия (Cs^+) [Schmitt, Koepsell, 2005], а ОСТ2 кролика еще и ион кадмия (Cd^{2+}) [Soodvilai et al., 2011]. В условиях низкого мембранного потенциала ОСТ2 крысы транспортирует неорганические катионы совместно с органическими [Schmitt et al., 2009].

ОСТ3 человека переносит анестетик лидокаин, препарат против аритмии квинидин, метформин, этилэфрин (гипотонические состояния), оксиплатин, ламивудин [Nies et al., 2010].

Транспортная активность ОСТN1 и ОСТN2 может быть связана с градиентами как ионов Na, так и протонов [Koepsell et al., 2007]. ОСТN1 человека участвует в трансмембранном транспорте таких катионов, как ТЕА, ацетилхолин [Pochini et al., 2011], гуанидина, пириламина, верапамила, антихолинэргические спазмолитики ипратропиум и тиотропиум [Nakamura et al., 2010] и, возможно, канцеростатики митоксантрон и доксорубин [Koepsell et al., 2007; Okabe et al., 2008]. Этот белок также переносит цвиттерионы, например антиоксидант эрготионеин, глицин-бетаин, бетоницин, стахидрин, L-карнитин и противосудорожный препарат габапентин [Koepsell et al., 2007; Urban et al., 2007].

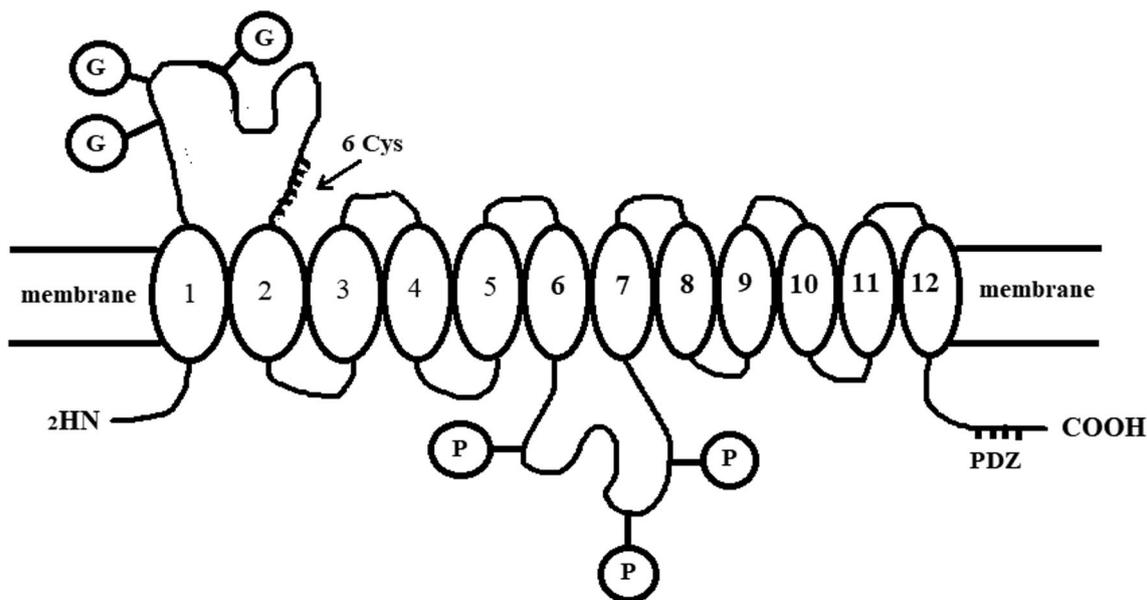
ОСТN2 функционирует как ко-транспортер и проявляет высокое сродство к Na^+ -L-карнитину. Он, как Na-зависимый транспортер, также переносит ацетил-L-карнитин, бутирил-L-карнитин [Srinivas et al., 2007], пивалоилкарнитин, валпроилкарнитин [Ohnishi et al., 2008], кардиопротектор милдронат [Grigat et al., 2009], β -лактам антибиотика цефалоридина и эметин [Koepsell et al., 2007]. Тем не менее у человека ОСТN2 действует как полиспецифичный, Na^+ -независимый транспортер органических катионов [Koepsell et al., 2007], таких как ТЕА, холин, пириламин, верапамил, шпиронолактон [Grube et al., 2006], оксиплатин [Jong et al., 2011], ипратропиум, тиотропиум [Nakamura et al., 2010] и кворум-сенсинг (quorum-sensing) катионный пентапептид CSF (Competence and Sporulating Factor), активирующий внутриклеточные пути передачи сигналов стресса и секретлируемый *Bacillus subtilis* [Koepsell et al., 2007; Konishi et al., 2013]. У ОСТN2 разные сайты связывания карнитина и ТЕА [Seth et al., 1999].

У ОСТ6 по сравнению с другими транспортерами органических катионов существенно

более ограничена субстратная специфичность. ОСТ6 человека проявляет высокое сродство к L-карнитину. Относительно карнитина белок является антипортером и не полностью зависит от концентрации внеклеточных ионов Na^+ , хотя они совместно с pH изменяют транспортную активность белка [Enomoto et al., 2002]. Кроме карнитина ОСТ6 переносит различные органические катионы, такие как ТЕА, спермидин, доксорубин и блеомицин А5 [Koepsell et al., 2007; Aouida et al., 2010]. Транспорт L-карнитина частично зависит от присутствия ионов Na^+ , тогда как транспорт доксорубина не зависит. Экспрессия ОСТ6 в клетках эндометрия усиливается под действием прогестерона [Sato et al., 2007].

Структура ОСТ

ОСТ сходны по своей структуре с другими белками суперсемейства MFS. Они состоят из 543–557 аминокислот, которые формируют 12 трансмембранных спиралей (доменов). Эти домены организованы как N- и C-концевые упаковки, из которых 6 спиралей показывают псевдодвухскладчатую симметрию, перпендикулярную мембране. Каждая связка содержит три секвенциальные спирали с инвертированной топологией. Ортологи ОСТ1, ОСТ2 и ОСТ3 человека состоят из 554, 555 и 556 аминокислотных остатков соответственно. N- и C-концевые участки молекулы расположены внутриклеточно. Большая внеклеточная петля между первым и вторым трансмембранными доменами (110 аминокислотных остатков) содержит три сайта N-гликозилирования и 6 консервативных остатков цистеина (рис.). Эти остатки обеспечивают точный фолдинг, позиционирование в плазматической мембране, перенос и образование гомоолигомеров ОСТ [Brast et al., 2011; Keller et al., 2011]. Большая внутриклеточная петля, связывающая спирали 6 и 7, предположительно имеет множественные сайты фосфорилирования, медиаторами которого выступают протеинкиназы А (PKA), С (PKC), G (PKG), казеинкиназа 2 (CK2) и/или кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II (CaMKII), которые расположены внутри или рядом с доменами 6 и 7 [Burckhardt, Wolff, 2000]. Некоторые особенности являются уникальными для сочленов семейства SLC22, например, специфическая последовательность [-Сер/Тре]-Иле-Вал-Тре-Глу-[Фен/Три]-[Асп/Асн]-Лей-Вал-Цис- перед спиралью 2 [Schomig et al., 1998]. ОСТ1 и ОСТ2 сходны на 70 % по аминокислотному составу и примерно на 50 % с ОСТ3 [Zhang et al., 1997; Gründemann et al., 1998; Gorboulev et al.,



Структура транспортера OCTN2:

1–12 – трансмембранные домены; G – сайты гликозилирования; P – сайты фосфорилирования; 6Cys – 6 остатков цистеина; PDZ – консенсусная последовательность для связи PDZK белками

Structure of transporter OCTN2:

1–12 – transmembrane helices; G – N-linked glycosylation sites; P – consensus sites for phosphorylation; 6Cys – six conserved cysteine residues; PDZ – consensus sequence for link with PDZK proteins

1999]. Транспортеры имеют АТФ/ГТФ-связывающую последовательность на второй внутриклеточной петле [Tamai et al., 1997; Wu et al., 1998]. Сходство OCT6 с OCT1 и OCTN2 не превышает 38 и 37 % соответственно [Enomoto et al., 2002]. Так же, как и в случае с транспортерами органических анионов (OATP и OAT), было использовано моделирование по гомологии на базе MFS транспортеров LacY и GlpT, являющихся модельными объектами сайт-направленных исследований, для описания предполагаемой трехмерной структуры OCT1 [Popp et al., 2005] и OCT2 [Zhang et al., 2005]. N- и C-концевые половины белков формируют щель, состоящую из аминокислотных остатков N-концевых трансмембранных доменов 1, 2, 4, 5 и C-концевых доменов 7, 8, 10, 11, а связывание с лигандами и перенос субстратов предположительно происходит при взаимодействии с аминокислотными остатками, обращенными внутрь щели. Согласно этой модели вероятным представляется взаимодействие субстратов с OCT1 не через одиночный связывающий сайт, а через субстрат-связывающий регион [Koepsell, 2011]. Экспериментально показано, что пять аминокислот в субстрат-связывающем регионе могут взаимодействовать как с внеклеточными, так и с внутриклеточными субстратами. В частности, такой аминокислотой является высококонсервативный (у всех OCT) остаток

аспарагиновой кислоты в позиции 475 домена 11 (у rOCT1), который усиливает эффект связывания с лигандами [Gorboulev et al., 1999]. Возможно, этот механизм является частью общей системы транспорта [Volk et al., 2009; Koepsell, 2011]. Ранее были идентифицированы два аминокислотных остатка, влияющие на способность кортикостерона ингибировать транспорт TEA⁺ у rOCT2 [Gorboulev et al., 2005]. При замещении Лей447 и Глн448 в домене 10 у rOCT1 на соответствующие кислоты, специфичные для rOCT2 (мутант rOCT1 (L447Y, Q448E)), значение IC₅₀ ингибирования кортикостероном C¹⁴-TEA⁺ снижалось до показателей, характерных для rOCT2. Константа Михаелиса – Ментен для связывания MPP⁺ также снижалась у rOCT1 (L447Y, Q448E), что подтверждает расположение Лей447 и Глн448 в субстрат-связывающем регионе. Аминокислотные остатки Фен160 (спираль 2), Три218 (спираль 4), Арг440 и Лей447 (спираль 10), Асп475 (спираль 11) спрятаны в глубине полостей как входящих, так и выходящих поверхностей субстрат-связывающих щелей. Все эти остатки принимают участие в связывании кортикостерона на любой стороне плазматической мембраны, что критично для аффинных свойств MPP⁺ и TEA⁺. Структурные модели входных и выходных конформаций щели rOCT1 [Popp et al., 2005; Gorbunov et al., 2008] подтверждают, что Лей447

может быть доступен как на выходящей, так и на входящей поверхности щели, тогда как Gln448 предположительно доступен только на входящей поверхности щели. Эти модели также раскрывают структурную основу дифференциальной селективности OСТ1 и OСТ2 для отдельных лигандов. Например, rOСТ2 имеет в 40 раз более высокое сродство к кортикостерону, чем rOСТ1 [Gorboulev et al., 2005], а у кролика OСТ2 имеет в 40 раз более высокое сродство к циметидину, чем OСТ1 [Zhang et al., 2005]. В обоих случаях относительное сродство может изменяться путем замены остатка глутаминовой кислоты, найденной у всех ортологов OСТ2 в домене 10 в позиции 448/447 (крыса, кролик соответственно), на остаток глутамина, обнаруженный у всех ортологов OСТ1. Этот сайт можно рассматривать как определяющий элемент взаимодействия с лигандами, используемыми этими транспортерами в путях переноса.

У OСТ и OСТN2 показано наличие на С-концевом участке молекулы так называемой PDZ-консенсусной последовательности, состоящей из четырех аминокислотных остатков, которая индивидуальна для каждого транспортера и через которую транспортеры взаимодействуют с белком PDZK1, что стимулирует у них транспортные функции [Kato et al., 2006]. Показано, что встраивание OСТN1 и OСТN2 в мембрану щеточной каймы энтероцитов регулируется белками, содержащими PDZ-домен [Kato et al., 2005].

Участие OСТ в дистанционной межорганной коммуникации

Гипотеза дистанционного опознавания и сигнализации (remote sensing and signaling hypothesis) предполагает широкое участие транспортеров сем. SLC22 (не только транспортеров органических анионов, а также OСТ и OСТN) в регуляции концентраций различных субстратов [Nigam et al., 2015]. В настоящее время растет поток информации об участии транспортеров в реализации механизмов коммуникации между клетками и органами одной особи, взаимосвязи между особями и, возможно, между видами [Ahn, Nigam, 2009]. Например, транспортеры семейств SLC (импортеры) и ABC (ATP-binding cassette, экспортеры), экспрессируемые в барьерном эпителии, служащем интерфейсом для жидких компартментов в органах, таких как мозг, глаза, уши, печень и почки, связаны с обработкой большого числа циркулирующих эндогенных метаболитов и/или токсинов. Эндогенные субстраты, гене-

рируемые в одном органе, могут вовлекаться в циркуляцию через группу транспортеров, в свою очередь эндогенные субстраты могут транспортироваться и удаляться через почки другим составом SLC/ABC-транспортеров. В соответствии с этой точкой зрения SLC и ABC в почках поддерживают общий гомеостаз тех или иных субстратов, тогда как транспортеры в том или ином органе поддерживают гомеостаз на уровне того или иного органа. Эта скоординированная обработка субстратов, скорее всего, достигается комбинацией набора транспортеров, например, SLC-SLC или SLC-ABC со сходной субстратной спецификой [Wu et al., 2011].

OСТN2, являющийся транспортером карнитина, играет важную роль в метаболизме жирных кислот в митохондриях. OСТN2 и ABC совместно регулируют уровень карнитина [Wu et al., 2011]. Абсорбция карнитина из внешних источников происходит в тонком кишечнике. Карнитин через апикальную мембрану транспортируется без участия Na^+ в энтероциты. Затем при участии ABC-транспортеров перемещается через базолатеральную мембрану энтероцитов и, вероятно, вовлекается в циркуляцию внутри организма [Klaassen, Aleksunes, 2010]. Еще один яркий пример дистанционной коммуникации. Показан высокий уровень экспрессии OСТN2 в апикальную поверхность синцитиотрофобластов плаценты [Grube et al., 2005]. У OСТN2-дефицитных мышей уровень карнитина в плаценте и у эмбрионов резко снижен, а уровень активности ферментов, отвечающих за метаболизм жирных кислот в митохондриях, превышал таковой у нормальных особей. Этот факт указывает на главную роль OСТN2 в доставке карнитина развивающимся эмбрионам, что в условиях дефицита карнитина усиливает риск дефектного развития [Grube et al., 2005]. Синтез и перераспределение карнитина между органами носит системный характер и имеет все признаки межорганной коммуникации. Обычно синтез карнитина происходит в печени. У самок в период лактации его синтез резко возрастает в молочных железах наряду с повышенным расходом в печени, которое сопровождается снижением энзиматической и транскрипционной активности, в том числе транспортной активности, ассоциированной с синтезом и перераспределением карнитина [Gutgesell et al., 2009].

Заключение

Транспортеры органических катионов (OСТ) являются сочленами семейства SLC22. Моле-

кулярное разнообразие этих белков по сравнению с транспортерами органических анионов (ОАТ) существенно меньше. К настоящему времени идентифицировано три транспортера органических катионов OCT1, 2, 3 (*SLC22A1*, 2, 3), а также три транспортера карнитин/цвиттер-ионов OCT6 (*SLC22A16*), OCTN1 (*SLC22A4*), OCTN2 (*SLC22A5*). Они осуществляют пассивную диффузию в любом направлении небольших органических катионов эндогенного и экзогенного происхождения по электрохимическому градиенту независимо от ионов Na⁺ и Cl⁻.

Важность изучения ОСТ в настоящее время не вызывает сомнений, так как имеет выраженный медицинский аспект, связанный с разработкой методов и подходов, с помощью которых можно оценивать эффективность и последствия применения вновь создаваемых лекарственных препаратов.

Достаточно большой массив проведенных исследований однозначно указывает на важную роль транспортеров семейства SLC в осуществлении взаимосвязи между метаболическими процессами, передаче сигнала, преобразовании разного рода эндогенных метаболитов, лекарств и токсинов. Однако многие вопросы о механизмах работы транспортеров ОСТ остаются пока нерешенными. Поэтому необходимо продолжать исследования в области молекулярной, клеточной, структурной и органной биологии отдельных сочленов семейства SLC22.

Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0221-2017-0050 (№ г. р. АА-АА-А17-117031710039-3) «Биохимические механизмы, определяющие сходство и различия в развитии адаптаций у гидробионтов морских и пресноводных экосистем»).

Литература

Смирнов Л. П., Суховская И. В., Борвинская Е. В. 1. Транспортеры органических анионов (ОАТ). Молекулярное разнообразие, структура, функция, участие в функционировании системы биотрансформации ксенобиотиков у животных (обзор) // Труды КарНЦ РАН. 2017а. № 12. С. 29–42. doi: 10.17076/eb622

Смирнов Л. П., Суховская И. В., Борвинская Е. В. 2. Транспортеры органических анионов (ОАТР). Свойства, структура, участие в процессах биотрансформации ксенобиотиков у животных (обзор). Труды КарНЦ РАН. 2017б. № 12. С. 43–56. doi: 10.17076/eb629

Ahn S. Y., Nigam S. K. Toward a systems level understanding of organic anion and other multispecific drug transporters: a remote sensing and signaling hypo-

thesis // *Mol. Pharmacol.* 2009. Vol. 76. P. 481–490. doi: 10.1124/mol.109.056564

Aouida M., Poulin R., Ramotar D. The human carnitine transporter SLC22A16 mediates high affinity uptake of the anticancer polyamine analogue bleomycin-A5 // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. P. 6275–6284. doi: 10.1074/jbc.M109.046151

Bacq A., Balasse L., Biala G., Guiard B., Gardier A. M., Schinkel A., Louis F., Vialou V., Martres M.-P., Chevarin C., Hamon M., Giros B., Gautron S. Organic cation transporter 2 controls brain norepinephrine and serotonin clearance and antidepressant response // *Mol. Psychiatry.* 2011. Vol. 17. P. 926–938.

Barendt W. M., Wright S. H. The human organic cation transporter (hOCT2) recognizes the degree of substrate ionization // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 22491–22496. doi: 10.1074/jbc.M203114200

Brast S., Grabner A., Susic S., Sitte H. H., Hermann E., Pavenstadt H., Schlatter E., Ciarimboli G. The cysteines of the extracellular loop are crucial for trafficking of human organic cation transporter 2 to the plasma membrane and are involved in oligomerization // *Faseb J.* 2011. Vol. 26. P. 976–986.

Burckhardt G., Wolff N. A. Structure of renal organic anion and cation transporters // *American Journal of Physiology. Renal Physiology.* 2000. Vol. 278. P. F853–F866.

Chien H.-C., Zur A. A., Maurer T. S., Yee S.-W., Tolsma J., Jasper P., Scott D. O., Giacomini K. M. Rapid method to determine intracellular drug concentrations in cellular uptake assays: application to metformin in OCT1-transfected HEK cells // *Drug Metab. Dispos.* 2016. Vol. 44. P. 356–364. doi: 10.1124/dmd.115.066647

Ciarimboli G., Schlatter E. Regulation of organic cation transport // *Pflugers Arch.* 2005. Vol. 449. P. 423–441. doi: 10.1007/s00424-004-1355-5

Ciarimboli G., Deuster D., Knief A., Sperling M., Holtkamp M., Edemir B., Pavenstadt H., Lanvers-Kaminsky C., am Zehnhoff-Dinnesen A., Schinkel A. H., Koepsell H., Jurgens H., Schlatter E. Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions // *Am. J. Pathol.* 2010. Vol. 176. P. 1169–1180. doi: 10.2353/ajpath.2010.090610

Ciarimboli G., Holle S. K., Vollenbrocker B., Hagos Y., Reuter S., Burckhardt G., Bierer S., Herrmann E., Pavenstadt H., Rossi R., Kleta R., Schlatter E. New clues for nephrotoxicity induced by ifosfamide: preferential renal uptake via the human organic cation transporter 2 // *Mol. Pharm.* 2011. Vol. 8. P. 270–279. doi: 10.1021/mp100329u

Ciarimboli G. Role of organic cation transporters in drug-induced toxicity // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2011. Vol. 7. P. 159–174. doi: 10.1517/17425255.2011.547474

Cotton L. M., Rodriguez C. M., Suzuki K., Orgebin-Crist M.-C., Hinton B. T. Organic cation/carnitine transporter, OCTN2, transcriptional activity is regulated by osmotic stress in epididymal cells // *Mol. Reprod. Dev.* 2010. Vol. 77. P. 114–125. doi: 10.1002/mrd.21122

Enomoto A., Wempe M. F., Tsuchida H., Shin H. J., Cha S. H., Anzai N., Goto A., Sakamoto A., Niwa T., Kanai Y., Anders M. W., Endou H. Molecular identification

of a novel carnitine transporter specific to human testis. Insights into the mechanism of carnitine recognition // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 36262–36271. doi: 10.1074/jbc.M203883200

Eraly S. A., Nigam S. K. Novel human cDNAs homologous to *Drosophila* Orct and mammalian carnitine transporters // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. Vol. 297. P. 1159–1166.

Garrett Q., Xu S., Simmons P. A., Vehige J., Flanagan J. L., Willcox M. D. Expression and localization of carnitine/organic cation transporter OCTN1 and OCTN2 in ocular epithelium // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008. Vol. 49. P. 4844–4849. doi: 10.1167/iovs.07-1528

Gilchrist S. E., Alcorn J. Lactation stage-dependent expression of transporters in rat whole mammary gland and primary mammary epithelial organoids // *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2010. Vol. 24. P. 205–214. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00760x

Gong S., Lu X., Xu Y., Swiderski C. F., Jordan C. T., Moscow J. A. Identification of OCT6 as a novel organic cation transporter preferentially expressed in hematopoietic cells and leukemias // *Exp. Hematol.* 2002. Vol. 30. P. 1162–1169.

Gorboulev V., Shatskaya N., Volk C., Koepsell H. Subtype-specific affinity for corticosterone of rat organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 depends on three amino acids within the substrate binding region // *Mol. Pharmacol.* 2005. Vol. 67. P. 1612–1619. doi: 10.1124/mol.104.008821

Gorboulev V., Volk C., Arndt P., Akhoundova A., Koepsell H. Selectivity of the polyspecific cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate // *Mol. Pharmacol.* 1999. Vol. 56. P. 1254–1261.

Gorbunov D., Gorboulev V., Shatskaya N., Mueller T., Bamberg E., Friedrich T., Koepsell H. High-affinity cation binding to organic cation transporter 1 induces movement of helix 11 and blocks transport after mutations in a modeled interaction domain between two helices // *Mol. Pharmacol.* 2008. Vol. 73. P. 50–61. doi: 10.1124/mol.107.040170

Grigat S., Fork C., Bach M., Golz S., Geerts A., Schömig E., Gründemann D. The carnitine transporter SLC22A5 is not a general drug transporter, but it efficiently translocates mildronate. *Drug Metab. Dispos.* 2009. Vol. 37. P. 330–337. doi: 10.1124/dmd.108.023929

Grube M., Meyer Zu Schwabedissen H., Draber K., Präger D., Möritz K.-U., Linnemann K., Fusch C., Jedlitschky G., Kroemer H. K. Expression, localization, and function of the carnitine transporter octn2 (slc22a5) in human placenta // *Drug Metab Dispos.* 2005. Vol. 33. P. 31–37. doi: 10.1124/dmd.104.001560

Grube M., Meyer zu Schwabedissen H. E. U., Präger D., Haney J., Möritz K.-U., Meissner K., Rosskopf D., Eckel L., Böhm M., Jedlitschky G., Kroemer H. K. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5) // *Circulation.* 2006. Vol. 113. P. 1114–1122. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.586107

Gründemann D., Schechinger B., Rappold G. A., Schömig E. Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine trans-

porter // *Nat. Neurosci.* 1998. Vol. 1. P. 349–351. doi: 10.1038/1557

Gupta S., Wulf G., Henjakovic M., Koepsell H., Burckhardt G., Hagos Y. Human organic cation transporter 1 is expressed in lymphoma cells and increases the susceptibility to irinotecan and paclitaxel // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011. Vol. 341. P. 16–23. doi: 10.1124/jpet.111.190561

Gutgesell A., Ringseis R., Brandsch C., Stangl G. I., Hirche F., Eder K. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and enzymes of carnitine biosynthesis in the liver are down-regulated during lactation in rats // *Metabolism.* 2009. Vol. 58. P. 226–232. doi: 10.1016/j.metabol.2008.09.018

Harper J. N., Wright S. H. Multiple mechanisms of ligand interaction with the human organic cation transporter, OCT2 // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2012. Vol. 304. P. F56–F67.

Horvath G., Schmid N., Fragoso M. A., Schmid A., Conner G. E., Salathe M., Wanner A. Epithelial organic cation transporters ensure pH-dependent drug absorption in the airway // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2007. Vol. 36. P. 53–60. doi: 10.1165/rcmb.2006-0230OC

Iwata D., Kato Y., Wakayama T., Sai Y., Kubo Y., Iseki S., Tsuji A. Involvement of carnitine/organic cation transporter OCTN2 (SLC22A5) in distribution of its substrate carnitine to the heart // *Drug Metab. Pharmacokin.* 2008. Vol. 23. P. 207–215.

Januszewicz E., Pajak B., Gajkowska B., Samluk L., Djavadian R. L., Hinton B. T., Nalecz K. A. Organic cation/carnitine transporter OCTN3 is present in astrocytes and is up-regulated by peroxisome proliferators-activator receptor agonist // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009. Vol. 41. P. 2599–2609. doi: 10.1016/j.biocel.2009.08.020

Jong N. N., Nakanishi T., Liu J. J., Tamai I., McKeage M. J. Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in over-expressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011. Vol. 338. P. 537–547. doi: 10.1124/jpet.111.181297

Kato Y., Sai Y., Yoshida K., Watanabe C., Hirata T., Tsuji A. PDZK1 Directly Regulates the Function of Organic Cation/Carnitine Transporter OCTN2. *Mol. Pharmacol.* 2005. Vol. 67. P. 734–743. doi: 10.1124/mol.104.002212.

Kato Y., Watanabe C., Tsuji A. Regulation of drug transporters by PDZ adaptor proteins and nuclear receptors // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006. Vol. 27. P. 487–500.

Keller T., Egenberger B., Gorboulev V., Bernhard F., Uzelac Z., Gorbunov D., Wirth C., Koppatz S., Dutsch V., Hunte C., Sitte H. H., Koepsell H. The large extracellular loop of organic cation transporter 1 influences substrate affinity and is pivotal for oligomerization // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. P. 37874–37886. doi: 10.1074/jbc.M111.289330

Klaassen C. D., Aleksunes L. M. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev.* 2010. Vol. 62. P. 1–96. doi: 10.1124/pr.109.002014

Kobayashi D., Tamai I., Sai Y., Yoshida K., Wakayama T., Kido Y., Nezu J., Iseki S., Tsuji A. Transport of carnitine and acetylcarnitine by carnitine/organic cation transporter (OCTN) 2 and OCTN3 into epididymal

- spermatozoa. *Reproduction*. 2007. Vol. 134. P. 651–658. doi: 10.1530/REP-06-0173
- Koepsell H., Endou H. The SLC22 drug transporter family // *Pflugers Arch*. 2004. Vol. 447. P. 666–676. doi: 10.1007/s00424-003-1089-9
- Koepsell H., Lips K., Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications // *Pharm. Res*. 2007. Vol. 24. P. 1227–1251. doi: 10.1007/s11095-007-9254-z
- Koepsell H. Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends Pharmacol. Sci*. 2004. Vol. 25. P. 375–381. doi: 10.1016/j.tips.2004.05.005
- Koepsell H., Schmitt B. M., Gorboulev V. Organic cation transporters. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. Sci*. 2003. Vol. 150. P. 36–90. doi: 10.1007/s10254-003-0017-x
- Koepsell H. Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. *Biol. Chem*. 2011. Vol. 392. P. 95–101. doi: 10.1515/BC.2011.009
- Koepsell H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions // *Mol. Aspects Med*. 2013. Vol. 34. P. 413–435. doi: 10.1016/j.mam.2012.10.010
- Konishi H., Fujiya M., Kohgo Y. Traffic Control of Bacteria-Derived Molecules: A New System of Host-Bacterial Crosstalk // *Int. J. Cell Biol*. 2013. Vol. 2013. P. 1–8. doi: 10.1155/2013/757148
- Kwok B., Yamauchi A., Rajesan R., Chan L., Dhilon U., Gao W., Xu H., Wang B., Takahashi S., Semple J., Tamai I., Nezu J., Tsuji A., Harper P., Ito S. Carnitine/xenobiotics transporters in the human mammary gland epithelia, MCF12A // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2006. Vol. 290. P. R793–R802. doi: 10.1152/ajpregu.00087.2005
- Lamhonwah A.-M., Mai L., Chung C., Lamhonwah D., Ackerley C., Tein I. Upregulation of mammary gland OCTNs maintains carnitine homeostasis in suckling infants. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2011. Vol. 404. P. 1010–1015. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.100
- Lin C.-J., Tai Y., Huang M.-T., Tsai Y.-F., Hsu H.-J., Tzen K.-Y., Liou H.-H. Cellular localization of the organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in brain microvessel endothelial cells and its implication for MPTP transport across the blood – brain barrier and MPTP-induced dopaminergic toxicity in rodents // *J. Neurochem*. 2010. Vol. 114. P. 717–727. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06801.x
- Ling B., Alcorn J. Acute administration of cefepime lowers L-carnitine concentrations in early lactation stage rat milk // *J. Nutr*. 2008. Vol. 138. P. 1317–1322. doi: 10.1093/jn/138.7.1317
- Lips K. S., Volk C., Schmitt B. M., Pfeil U., Arndt P., Miska D., Ermert L., Kummer W., Koepsell H. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2005. Vol. 33. P. 79–88. doi: 10.1165/rcmb.2004-0363OC
- Lovejoy K. S., Todd R. C., Zhang S., McCormick M. S., D'Aquino J. A., Reardon J. T., Sancar A., Giacomini K. M., Lippard S. J. Cis-Diammine (pyridine) chloroplatinum (II), a monofunctional platinum (II) antitumor agent: Uptake, structure, function, and prospects // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2008. Vol. 105. P. 8902–8907. doi: 10.1073/pnas.0803441105
- Markova N. G., Karaman-Jurukovska N., Dong K. K., Damaghi N., Smiles K. A., Yarosh D. B. Skin cells and tissue are capable of using L-ergothioneine as an integral component of their antioxidant defense system // *Free Radical Biol. Med*. 2009. Vol. 46. P. 1168–1176. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.021
- Meier Y., Eloranta J. J., Darimont J., Ismail M. G., Hiller C., Fried M., Kullak-Ublick G. A., Vavricka S. R. Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract // *Drug Metab. Dispos*. 2007. Vol. 35. P. 590–594. doi: 10.1124/dmd.106.013342
- Minuesa G., Volk C., Molina-Arcas M., Gorboulev V., Erkizia I., Arndt P., Clotet B., Pastor-Anglada M., Koepsell H., Martinez-Picado J. Transport of lamivudine [(-)-beta-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine] and high-affinity interaction of nucleoside reverse transcriptase inhibitors with human organic cation transporters 1, 2, and 3 // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2009. Vol. 329. P. 252–261. doi: 10.1124/jpet.108.146225
- More S. S., Li S., Yee S. W., Chen L., Xu Z., Jablons D. M., Giacomini K. M. Organic cation transporters modulate the uptake and cytotoxicity of picoplatin, a third-generation platinum analogue // *Mol. Cancer Ther*. 2010. Vol. 9. P. 1058–1069. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1084
- Moreno-Navarrete J. M., Ortega F. J., Rodriguez-Hermosa J. I., Sabater M., Pardo G., Ricart W., Fernandez-Real J. M. OCT1 Expression in adipocytes could contribute to increased metformin action in obese subjects // *Diabetes*. 2011. Vol. 60. P. 68–176. doi: 10.2337/db10-0805
- Motohashi H., Sakurai Y., Saito H., Masuda S., Urakami Y., Goto M., Fukatsu A., Ogawa O., Inui K. I. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney // *J. Am. Soc. Nephrol*. 2002. Vol. 13. P. 866–874.
- Müller J., Lips K. S., Metzner L., Neubert R. H., Koepsell H., Brandsch M. Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT) // *Biochem. Pharmacol*. 2005. Vol. 70. P. 1851–1860. doi: 10.1016/j.bcp.2005.09.011
- Nakamura T., Nakanishi T., Haruta T., Shirasaka Y., Keogh J. P., Tamai I. Transport of ipratropium, an anti-chronic obstructive pulmonary disease drug, is mediated by organic cation/carnitine transporters in human bronchial epithelial cells: implications for carrier-mediated pulmonary absorption // *Mol. Pharmacol*. 2010. Vol. 7. P. 187–195. doi: 10.1021/mp900206j
- Nies A. T., Koepsell H., Winter S., Burk O., Klein K., Kerb R., Zanger U. M., Keppler D., Schwab M., Schaeffeler E. Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver // *Hepatology*. 2009. Vol. 50. P. 1227–1240. doi: 10.1002/hep.23103
- Nies A. T., Koepsell H., Damme K., Schwab M. Organic cation transporters (OCTs, MATes), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy // *Handbook Exp. Pharmacol*. 2010. Vol. 201. P. 105–167. doi: 10.1007/978-3-642-14541-4_3
- Nies A. T., Hofmann U., Resch C., Schaeffeler E., Rius M., Schwab M. Proton pump inhibitors inhibit met-

formin uptake by organic cation transporters (OCTs) // *PLoS ONE*. 2011.6(7). e22163. doi: 10.1371/journal.pone.0022163

Nigam S. K., Bush K. T., Martovetsky G., Ahn S.-Y., Liu H. C., Richard E., Bhatnagar V., Wu W. The organic anion transporter (oat) family: a systems biology perspective // *Physiol. Rev.* 2015. Vol. 95. P. 83–123. doi: 10.1152/physrev.00025.2013

Nishimura M., Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies // *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2005. Vol. 20. P. 452–477.

Ohnishi S., Okamura N., Sakamoto S., Hasegawa H., Norikura R., Kanaoka E., Takahashi K., Horie K., Sakamoto K., Baba T. Role of Na⁺/L-carnitine transporter (OCTN2) in renal handling of pivaloylcarnitine and valproylcarnitine formed during pivalic acid-containing prodrugs and valproic acid treatment // *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2008. Vol. 23. P. 293–303.

Okabe M., Szakacs G., Reimers M. A., Suzuki T., Hall M. D., Abe T., Weinstein J. N., Gottesman M. M. Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters // *Mol. Cancer Ther.* 2008. Vol. 7. P. 3081–3091. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0539

Ota K., Ito K., Akahira J., Sato N., Onogawa T., Moriya T., Unno M., Abe T., Niikura H., Takano T., Yaegashi N. Expression of organic cation transporter SLC22A16 in human epithelial ovarian cancer: a possible role of the adriamycin importer // *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2007. Vol. 26. P. 334–340. doi: 10.1097/01.pgp.0000236951.33914.1b

Pelis R. M., Wright S. H. SLC22, SLC44, and SLC47 Transporters – Organic Anion and Cation Transporters: Molecular and Cellular Properties // *Current Topics in Membranes*. 2014. Vol. 73. P. 233–261. doi: 10.1016/B978-0-12-800223-0.00006-2

Pochini L., Scalise M., Galluccio M., Amelio L., Indiveri C. Reconstitution in liposomes of the functionally active human OCTN1 (SLC22A4) transporter overexpressed in *Escherichia coli*. // *Biochem. J.* 2011. Vol. 439. P. 227–233. doi: 10.1042/BJ20110544

Popp C., Gorboulev V., Muller T. D., Gorbunov D., Shatskaya N., Koepsell H. Amino acids critical for substrate affinity of rat organic cation transporter 1 line the substrate binding region in a model derived from the tertiary structure of lactose permease // *Mol. Pharmacol.* 2005. Vol. 67. P. 1600–1611. doi: 10.1124/mol.104.008839

Saier M. H. Jr., Reddy V. S., Tamang D. G., Vastermark A. The transporter classification database // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. P. D251–258. doi: 10.1093/nar/gkt1097

Sata R., Ohtani H., Tsujimoto M., Murakami H., Koyabu N., Nakamura T., Uchiyumi T., Kuwano M., Nagata H., Tsukimori K., Nakano H., Sawada Y. Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005. Vol. 315. P. 888–895. doi: 10.1124/jpet.105.086827

Sato N., Ito K., Onogawa T., Akahira J., Unno M., Abe T., Niikura H., Yaegashi N. Expression of organic cation transporter SLC22A16 in human endometria // *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2007. Vol. 26. P. 53–60. doi: 10.1097/01.pgp.0000225845.67245.b3

Schmitt B. M., Koepsell H. Alkali cation binding and permeation in the rat organic cation transporter rOCT2 // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 24481–24490. doi: 10.1074/jbc.M414550200

Schmitt B. M., Gorbunov D., Schlachtbauer P., Egenberger B., Gorboulev V., Wischmeyer E., Müller T., Koepsell H. Charge-to-substrate ratio during organic cation uptake by rat OCT2 is voltage dependent and altered by exchange of glutamate 448 with glutamine // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2009. Vol. 296. P. F709 – F722. doi: 10.1152/ajprenal.90323.2008

Seth P., Wu X., Huang W., Leibach F. H., Ganapathy V. Mutations in novel organic cation transporter (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter, with differential effects on the organic cation transport function and the carnitine transport function // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 33388–33392.

Soodvilai S., Nantavishit J., Muanprasat C., Chatsudthipong V. Renal organic cation transporters mediated cadmium-induced nephrotoxicity // *Toxicol. Lett.* 2011. Vol. 204. P. 38–42. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.04.005

Schomig E., Spitzenberger F., Engelhard M., Martel F., Ordning N., Gründemann D. Molecular cloning and characterization of two novel transport proteins from rat kidney // *FEBS Letters*. 1998. Vol. 425. P. 79–86.

Srinivas S. R., Prasad P. D., Umapathy N. S., Ganapathy V., Shekhawat P. S. Transport of butyryl-L-carnitine, a potential prodrug, via the carnitine transporter OCTN2 and the amino acid transporter ATB⁰⁺ // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007. Vol. 293. P. G1046–G1053.

Tachampa K., Takeda M., Khamdang S., Noshiro-Kofuji R., Tsuda M., Jariyawat S., Fukutomi T., Sophasan S., Anzai N., Endou H. Interactions of organic anion transporters and organic cation transporters with mycotoxins // *J. Pharmacol. Sci.* 2008. Vol. 106. P. 435–443.

Tamai I., Yabuuchi H., Nezu J.-I., Sai Y., Oku A., Shimane M., Tsuji A. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1 // *FEBS Letters*. 1997. Vol. 419. P. 107–111.

Tokuhiro S., Yamada R., Chang X., Suzuki A., Kochi Y., Sawada T., Suzuki M., Nagasaki M., Ohtsuki M., Ono M., Furukawa H., Nagashima M., Yoshino S., Mabuchi A., Sekine A., Saito S., Takahashi A., Tsunoda T., Nakamura Y., Yamamoto K. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis // *Nat. Genet.* 2003. Vol. 35. P. 341–348. doi: 10.1038/ng1267

Tzvetkov M. V., Vormfelde S. V., Balen D., Meineke I., Schmidt T., Sehart D., Sabolic I., Koepsell H., Brockmoller J. The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2009. Vol. 86. P. 299–306. doi: 10.1038/clpt.2009.92

Urban T. J., Brown C., Castro R. A., Shah N., Mercer R., Huang Y., Brett C. M., Burchard E. G., Giacomini K. M. Effects of genetic variation in the novel organic cation transporter, OCTN1, on the renal clearance of gabapentin // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007. Vol. 83. P. 416–421. doi: 10.1038/sj.clpt.6100271

Volk C., Gorboulev V., Kotzsch A., Müller T. D., Koepsell H. Five amino acids in the innermost cavity of the substrate binding cleft of organic cation transporter 1 interact with extracellular and intracellular corticosterone // *Mol. Pharmacol.* 2009. Vol. 76. P. 275–289. doi: 10.1124/mol.109.054783

Wang T., Li J., Chen F., Zha Y., He X., Wan D., Gu J. Choline transporters in human lung adenocarcinoma: expression and functional implications // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2007. Vol. 39. P. 668–674.

Wang C., Urayl P., Mazumdar A., Mayer J. A., Brown P. H. SLC22A5/OCTN2 expression in breast cancer is induced by estrogen via a novel intronic estrogen-response element (ERE) // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. Vol. 134. P. 101–115. doi: 10.1007/s10549-011-1925-0

Winter T. N., Elmquist W. F., Fairbanks C. A. OCT2 and MATE1 provide bidirectional agmatine transport // *Mol. Pharm.* 2011. Vol. 8. P. 133–142. doi: 10.1021/mp100180a

Wu X., Prasad P. D., Leibach F. H., Ganapathy V. CDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. Vol. 246. P. 589–595. doi: 10.1006/bbrc.1998.8669

Wu W., Dnyanmote A. V., Nigam S. K. Remote Communication through Solute Carriers and ATP Bind-

ing Cassette Drug Transporter Pathways: An Update on the Remote Sensing and Signaling Hypothesis // *Mol. Pharmacol.* 2011. Vol. 79. P. 795–805. doi: 10.1124/mol.110.070607

Zhang L., Dresser M. J., Gray A. T., Yost S. C., Terashta S., Giacomini K. M. Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter // *Mol. Pharmacol.* 1997. Vol. 51. P. 913–921.

Zhang X., Shirahatti N. V., Mahadevan D., Wright S. H. A conserved glutamate residue in transmembrane helix 10 influences substrate specificity of rabbit OCT2 (SLC22A2) // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 34813–34822. doi: 10.1074/jbc.M506342200

Zhang T., Xiang C. D., Gale D., Carreiro S., Wu E. Y., Zhang E. Y. Drug transporter and cytochrome P450 mRNA expression in human ocular barriers: implications for ocular drug disposition // *Drug Metab. Dispos.* 2008. Vol. 36. P. 1300–1307. doi: 10.1124/dmd.108.021121

Zhu C., Nigam K. B., Date R. C., Bush K. T., Springer S. A., Saier M. H. Jr., Wu W., Nigam S. K. Evolutionary analysis and classification of OATs, OCTs, OCTNs, and other SLC22 transporters: structure-function implications and analysis of sequence motifs // *Plos ONE.* 2015. P. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0140569

Поступила в редакцию 17.05.2018

References

Smirnov L. P., Sukhovskaya I. V., Borvinskaya E. V. 1. Transportery organicheskikh anionov (OAT). Molekulyarnoe rasnoobrazie, funktsiya, struktura, uchastie v funktsionirovanii sistemy biotransformatsii ksenobiotikov u zhivotnykh [1. Organic anion transporters. Molecular diversity, structure, contribution to the functioning of the xenobiotic biotransformation system in animals (a review)]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2017a. No. 12. P. 28–42. doi: 10.17076/eb622

Smirnov L. P., Sukhovskaya I. V., Borvinskaya E. V. 2. Transportery organicheskikh anionov (OATP). Svoistva, struktura, uchastie v protsessakh biotransformatsii ksenobiotikov u zhivotnykh [2. Organic anion transporters of the SLCO Family. Properties, structure, contribution to the functioning of the xenobiotic biotransformation system in animals (a review)]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2017b. No. 12. P. 43–56. doi: 10.17076/eb629

Ahn S. Y., Nigam S. K. Toward a systems level understanding of organic anion and other multispecific drug transporters: a remote sensing and signaling hypothesis. *Mol. Pharmacol.* 2009. Vol. 76. P. 481–490. doi: 10.1124/mol.109.056564

Aouida M., Poulin R., Ramotar D. The human carnitine transporter SLC22A16 mediates high affinity uptake of the anticancer polyamine analogue bleomycin-A5. *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. P. 6275–6284. doi: 10.1074/jbc.M109.046151

Bacq A., Balasse L., Biala G., Guiard B., Gardier A. M., Schinkel A., Louis F., Vialou V., Martres M.-P., Chevarin C., Hamon M., Giros B., Gautron S. Organic cation transporter 2 controls brain norepinephrine and serotonin clearance and antidepressant response. *Mol. Psychiatry.* 2011. Vol. 17. P. 926–938.

Barendt W. M., Wright S. H. The human organic cation transporter (hOCT2) recognizes the degree of substrate ionization. *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 22491–22496. doi: 10.1074/jbc.M203114200

Brast S., Grabner A., Sucic S., Sitte H. H., Hermann E., Pavenstädt H., Schlatter E., Ciarimboli G. The cysteines of the extracellular loop are crucial for trafficking of human organic cation transporter 2 to the plasma membrane and are involved in oligomerization. *FASEB J.* 2011. Vol. 26. P. 976–986.

Burckhardt G., Wolff N. A. Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000. Vol. 278. P. F853–F866.

Chien H.-C., Zur A. A., Maurer T. S., Yee S.-W., Tolsma J., Jasper P., Scott D. O., Giacomini K. M. Rapid method to determine intracellular drug concentrations in cellular uptake assays: application to metformin in OCT1-transfected HEK cells. *Drug Metab. Dispos.* 2016. Vol. 44. P. 356–364. doi: 10.1124/dmd.115.066647

Ciarimboli G., Schlatter E. Regulation of organic cation transport. *Pflugers Arch.* 2005. Vol. 449. P. 423–441. doi: 10.1007/s00424-004-1355-5

Ciarimboli G., Deuster D., Knief A., Sperling M., Holtkamp M., Edemir B., Pavenstädt H., Lanvers-Kaminsky C., am Zehnhoff-Dinnesen A., Schinkel A. H., Koepsell H., Jurgens H., Schlatter E. Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *Am. J. Pathol.* 2010. Vol. 176. P. 1169–1180. doi: 10.2353/ajpath.2010.090610

Ciarimboli G., Holle S. K., Vollenbrocker B., Hagos Y., Reuter S., Burckhardt G., Bierer S., Herrmann E., Pavenstädt H., Rossi R., Kleita R., Schlatter E.

New clues for nephrotoxicity induced by ifosfamide: preferential renal uptake via the human organic cation transporter 2. *Mol. Pharm.* 2011. Vol. 8. P. 270–279. doi: 10.1021/mp100329u

Ciarimboli G. Role of organic cation transporters in drug-induced toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2011. Vol. 7. P. 159–174. doi: 10.1517/17425255.2011.547474

Cotton L. M., Rodriguez C. M., Suzuki K., Orgebin-Crist M.-C., Hinton B. T. Organic cation/carnitine transporter, OCTN2, transcriptional activity is regulated by osmotic stress in epididymal cells. *Mol. Reprod. Dev.* 2010. Vol. 77. P. 114–125. doi: 10.1002/mrd.21122

Enomoto A., Wempe M. F., Tsuchida H., Shin H. J., Cha S. H., Anzai N., Goto A., Sakamoto A., Niwa T., Kanai Y., Anders M. W., Endou H. Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis. Insights into the mechanism of carnitine recognition. *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 36262–36271. doi: 10.1074/jbc.M203883200

Eraly S. A., Nigam S. K. Novel human cDNAs homologous to Drosophila Orct and mammalian carnitine transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. Vol. 297. P. 1159–1166.

Garrett Q., Xu S., Simmons P. A., Vehige J., Flanagan J. L., Willcox M. D. Expression and localization of carnitine/organic cation transporter OCTN1 and OCTN2 in ocular epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008. Vol. 49. P. 4844–4849. doi: 10.1167/iovs.07-1528

Gilchrist S. E., Alcorn J. Lactation stage-dependent expression of transporters in rat whole mammary gland and primary mammary epithelial organoids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2010. Vol. 24. P. 205–214. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00760.

Gong S., Lu X., Xu Y., Swiderski C. F., Jordan C. T., Moscow J. A. Identification of OCT6 as a novel organic cation transporter preferentially expressed in hematopoietic cells and leukemias. *Exp. Hematol.* 2002. Vol. 30. P. 1162–1169.

Gorboulev V., Shatskaya N., Volk C., Koepsell H. Subtype-specific affinity for corticosterone of rat organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 depends on three amino acids within the substrate binding region. *Mol. Pharmacol.* 2005. Vol. 67. P. 1612–1619. doi: 10.1124/mol.104.008821

Gorboulev V., Volk C., Arndt P., Akhoundova A., Koepsell H. Selectivity of the polyspecific cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate. *Mol. Pharmacol.* 1999. Vol. 56. P. 1254–1261.

Gorbunov D., Gorboulev V., Shatskaya N., Mueller T., Bamberg E., Friedrich T., Koepsell H. High-affinity cation binding to organic cation transporter 1 induces movement of helix 11 and blocks transport after mutations in a modeled interaction domain between two helices. *Mol. Pharmacol.* 2008. Vol. 73. P. 50–61. doi: 10.1124/mol.107.040170

Grigat S., Fork C., Bach M., Golz S., Geerts A., Schömig E., Gründemann D. The carnitine transporter SLC22A5 is not a general drug transporter, but it efficiently translocates mildronate. *Drug Metab. Dispos.* 2009. Vol. 37. P. 330–337. doi: 10.1124/dmd.108.023929

Grube M., Meyer Zu Schwabedissen H., Draber K., Präger D., Möritz K.-U., Linnemann K., Fusch C.,

Jedlitschky G., Kroemer H. K. Expression, localization, and function of the carnitine transporter octn2 (slc22a5) in human placenta. *Drug Metab Dispos.* 2005. Vol. 33. P. 31–37. doi: 10.1124/dmd.104.001560

Grube M., Meyer zu Schwabedissen H. E. U., Präger D., Haney J., Möritz K.-U., Meissner K., Rosskopf D., Eckel L., Böhm M., Jedlitschky G., Kroemer H. K. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Circulation.* 2006. Vol. 113. P. 1114–1122. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.586107

Gründemann D., Schechinger B., Rappold G. A., Schömig E. Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat. Neurosci.* 1998. Vol. 1. P. 349–351. doi: 10.1038/1557

Gupta S., Wulf G., Henjakovic M., Koepsell H., Burckhardt G., Hagos Y. Human organic cation transporter 1 is expressed in lymphoma cells and increases the susceptibility to irinotecan and paclitaxel. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011. Vol. 341. P. 16–23. doi: 10.1124/jpet.111.190561

Gutgesell A., Ringseis R., Brandsch C., Stangl G. I., Hirche F., Eder K. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and enzymes of carnitine biosynthesis in the liver are down-regulated during lactation in rats. *Metabolism.* 2009. Vol. 58. P. 226–232. doi: 10.1016/j.metabol.2008.09.018

Harper J. N., Wright S. H. Multiple mechanisms of ligand interaction with the human organic cation transporter, OCT2. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2012. Vol. 304. P. F56–F67.

Horvath G., Schmid N., Fragoso M. A., Schmid A., Conner G. E., Salathe M., Wanner A. Epithelial organic cation transporters ensure pH-dependent drug absorption in the airway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2007. Vol. 36. P. 53–60. doi: 10.1165/rcmb.2006-0230OC

Iwata D., Kato Y., Wakayama T., Sai Y., Kubo Y., Iseki S., Tsuji A. Involvement of carnitine/organic cation transporter OCTN2 (SLC22A5) in distribution of its substrate carnitine to the heart. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2008. Vol. 23. P. 207–215.

Januszewicz E., Pajak B., Gajkowska B., Samluk L., Djavadian R. L., Hinton B. T., Nalecz K. A. Organic cation/carnitine transporter OCTN3 is present in astrocytes and is up-regulated by peroxisome proliferators-activator receptor agonist. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009. Vol. 41. P. 2599–2609. doi: 10.1016/j.biocel.2009.08.020

Jong N. N., Nakanishi T., Liu J. J., Tamai I., McKeage M. J. Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in over-expressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011. Vol. 338. P. 537–547. doi: 10.1124/jpet.111.181297

Kato Y., Sai Y., Yoshida K., Watanabe C., Hirata T., Tsuji A. PDZK1 Directly Regulates the Function of Organic Cation/Carnitine Transporter OCTN2. *Mol. Pharmacol.* 2005. Vol. 67. P. 734–743. doi: 10.1124/mol.104.002212

Kato Y., Watanabe C., Tsuji A. Regulation of drug transporters by PDZ adaptor proteins and nuclear receptors. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006. Vol. 27. P. 487–500.

- Keller T., Egenberger B., Gorboulev V., Bernhard F., Uzelac Z., Gorbunov D., Wirth C., Koppatz S., Dutsch V., Hunte C., Sitte H. H., Koepsell H. The large extracellular loop of organic cation transporter 1 influences substrate affinity and is pivotal for oligomerization. *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. P. 37874–37886. doi: 10.1074/jbc.M111.289330
- Klaassen C. D., Aleksunes L. M. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol. Rev.* 2010. Vol. 62. P. 1–96. doi: 10.1124/pr.109.002014
- Kobayashi D., Tamai I., Sai Y., Yoshida K., Wakayama T., Kido Y., Nezu J., Iseki S., Tsuji A. Transport of carnitine and acetylcarnitine by carnitine/organic cation transporter (OCTN) 2 and OCTN3 into epididymal spermatozoa. *Reproduction.* 2007. Vol. 134. P. 651–658. doi: 10.1530/REP-06-0173.
- Koepsell H., Endou H. The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch.* 2004. Vol. 447. P. 666–676. doi: 10.1007/s00424-003-1089-9
- Koepsell H., Lips K., Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm. Res.* 2007. Vol. 24. P. 1227–1251. doi: 10.1007/s11095-007-9254-z
- Koepsell H., Schmitt B. M., Gorboulev V. Organic cation transporters. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2003. Vol. 150. P. 36–90. doi: 10.1007/s10254-003-0017-x
- Koepsell H., Substrate recognition and translocation by polyspecific organic cation transporters. *Biol. Chem.* 2011. Vol. 392. P. 95–101. doi: 10.1515/BC.2011.009
- Koepsell H. Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 2004. Vol. 25. P. 375–381. doi: 10.1016/j.tips.2004.05.005
- Koepsell H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol. Aspects Med.* 2013. Vol. 34. P. 413–435. doi: 10.1016/j.mam.2012.10.010
- Konishi H., Fujiya M., Kohgo Y. Traffic Control of Bacteria-Derived Molecules: A New System of Host-Bacterial Crosstalk. *Int. J. Cell Biol.* 2013. Vol. 2013. P. 1–8. doi: 10.1155/2013/757148
- Kwok B., Yamauchi A., Rajesan R., Chan L., Dhillon U., Gao W., Xu H., Wang B., Takahashi S., Semple J., Tamai I., Nezu J., Tsuji A., Harper P., Ito S. Carnitine/xenobiotics transporters in the human mammary gland epithelia, MCF12A. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006. Vol. 290. P. R793–R802. doi: 10.1152/ajpregu.00087.2005
- Lamhonwah A.-M., Mai L., Chung C., Lamhonwah D., Ackerley C., Tein I. Upregulation of mammary gland OCTNs maintains carnitine homeostasis in suckling infants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. Vol. 404. P. 1010–1015. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.100
- Lin C.-J., Tai Y., Huang M.-T., Tsai Y.-F., Hsu H.-J., Tzen K.-Y., Liou H.-H. Cellular localization of the organic cation transporters, OCT1 and OCT2, in brain microvessel endothelial cells and its implication for MPTP transport across the blood – brain barrier and MPTP-induced dopaminergic toxicity in rodents. *J. Neurochem.* 2010. Vol. 114. P. 717–727. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06801.x
- Ling B., Alcorn J., Acute administration of cefepime lowers L-carnitine concentrations in early lactation stage rat milk. *J. Nutr.* 2008. Vol. 138. P. 1317–1322. doi: 10.1093/jn/138.7.1317
- Lips K. S., Volk C., Schmitt B. M., Pfeil U., Arndt P., Miska D., Ermert L., Kummer W., Koepsell H. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2005. Vol. 33. P. 79–88. doi: 10.1165/rcmb.2004-0363OC
- Lovejoy K. S., Todd R. C., Zhang S., McCormick M. S., D'Aquino J. A., Reardon J. T., Sancar A., Giacomini K. M., Lippard S. J. Cis-Diammine (pyridine) chloroplatinum (II), a monofunctional platinum (II) antitumor agent: Uptake, structure, function, and prospects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105. P. 8902–8907. doi: 10.1073/pnas.0803441105
- Markova N. G., Karaman-Jurukovska N., Dong K. K., Damaghi N., Smiles K. A., Yarosh D. B. Skin cells and tissue are capable of using L-ergothioneine as an integral component of their antioxidant defense system. *Free Radical Biol. Med.* 2009. Vol. 46. P. 1168–1176. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.021
- Meier Y., Eloranta J. J., Darimont J., Ismail M. G., Hiller C., Fried M., Kullak-Ublick G. A., Vavricka S. R. Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract. *Drug Metab. Dispos.* 2007. Vol. 35. P. 590–594. doi: 10.1124/dmd.106.013342
- Minuesa G., Volk C., Molina-Arcas M., Gorboulev V., Erkizia I., Arndt P., Clotet B., Pastor-Anglada M., Koepsell H., Martinez-Picado J. Transport of lamivudine [(-)-beta-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine] and high-affinity interaction of nucleoside reverse transcriptase inhibitors with human organic cation transporters 1, 2, and 3. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009. Vol. 329. P. 252–261. doi: 10.1124/jpet.108.146225
- More S. S., Li S., Yee S. W., Chen L., Xu Z., Jablons D. M., Giacomini K. M. Organic cation transporters modulate the uptake and cytotoxicity of picoplatin, a third-generation platinum analogue. *Mol. Cancer Ther.* 2010. Vol. 9. P. 1058–1069. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1084
- Moreno-Navarrete J. M., Ortega F. J., Rodriguez-Hermosa J. I., Sabater M., Pardo G., Ricart W., Fernandez-Real J. M. OCT1 Expression in adipocytes could contribute to increased metformin action in obese subjects. *Diabetes.* 2011. Vol. 60. P. 68–176. doi: 10.2337/db10-0805
- Motohashi H., Sakurai Y., Saito H., Masuda S., Urakami Y., Goto M., Fukatsu A., Ogawa O., Inui K. I. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002. Vol. 13. P. 866–874.
- Müller J., Lips K. S., Metzner L., Neubert R. H., Koepsell H., Brandsch M. Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochem Pharmacol.* 2005. Vol. 70. P. 1851–1860. doi: 10.1016/j.bcp.2005.09.011
- Nakamura T., Nakanishi T., Haruta T., Shirasaka Y., Keogh J. P., Tamai I. Transport of ipratropium, an anti-chronic obstructive pulmonary disease drug, is mediated by organic cation/carnitine transporters in human bronchial epithelial cells: implications for carrier-me-

- diated pulmonary absorption. *Mol. Pharmacol.* 2010. Vol. 7. P. 187–195. doi: 10.1021/mp900206j
- Nies A. T., Koepsell H., Winter S., Burk O., Klein K., Kerb R., Zanger U. M., Keppler D., Schwab M., Schaeffeler E. Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology.* 2009. Vol. 50. P. 1227–1240. doi: 10.1002/hep.23103
- Nies A. T., Koepsell H., Damme K., Schwab M. Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handbook of Exp. Pharmacol.* 2010. Vol. 201. P. 105–167. doi: 10.1007/978-3-642-14541-43
- Nies A. T., Hofmann U., Resch C., Schaeffeler E., Rius M., Schwab M. Proton pump inhibitors inhibit metformin uptake by organic cation transporters (OCTs). *PLoS ONE.* 2011. 6(7). e22163. doi: 10.1371/journal.pone.0022163
- Nigam S. K., Bush K. T., Martovetsky G., Ahn S.-Y., Liu H. C., Richard E., Bhatnagar V., Wu W. The organic anion transporter (oat) family: a systems biology perspective. *Physiol Rev.* 2015. Vol. 95. P. 83–123. doi: 10.1152/physrev.00025.2013
- Nishimura M., Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2005. Vol. 20. P. 452–477.
- Ohnishi S., Okamura N., Sakamoto S., Hasegawa H., Norikura R., Kanaoka E., Takahashi K., Horie K., Sakamoto K., Baba T. Role of Na⁺/L-carnitine transporter (OCTN2) in renal handling of pivaloylcarnitine and valproylcarnitine formed during pivalic acid-containing prodrugs and valproic acid treatment. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2008. Vol. 23. P. 293–303.
- Okabe M., Szakacs G., Reimers M. A., Suzuki T., Hall M. D., Abe T., Weinstein J. N., Gottesman M. M. Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. *Mol. Cancer Ther.* 2008. Vol. 7. P. 3081–3091. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0539
- Ota K., Ito K., Akahira J., Sato N., Onogawa T., Moriya T., Unno M., Abe T., Niikura H., Takano T., Yaegashi N. Expression of organic cation transporter SLC22A16 in human epithelial ovarian cancer: a possible role of the adriamycin importer. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2007. Vol. 26. P. 334–340. doi: 10.1097/01.pgp.0000236951.33914.1b
- Pelis R. M., Wright S. H. SLC22, SLC44, and SLC47 Transporters – Organic Anion and Cation Transporters: Molecular and Cellular Properties. *Current Topics in Membranes.* 2014. Vol. 73. P. 233–261. doi: 10.1016/B978-0-12-800223-0.00006-2
- Pochini L., Scalise M., Galluccio M., Amelio L., Indiveri C. Reconstitution in liposomes of the functionally active human OCTN1 (SLC22A4) transporter overexpressed in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 2011. Vol. 439. P. 227–233. doi: 10.1042/BJ20110544
- Popp C., Gorboulev V., Muller T. D., Gorbunov D., Shatskaya N., Koepsell H. Amino acids critical for substrate affinity of rat organic cation transporter 1 line the substrate binding region in a model derived from the tertiary structure of lactose permease. *Mol. Pharmacol.* 2005. Vol. 67. P. 1600–1611. doi: 10.1124/mol.104.008839
- Saier M. H. Jr., Reddy V. S., Tamang D. G., Vastermark A. The transporter classification database. *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. P. D251–258. doi: 10.1093/nar/gkt1097
- Sata R., Ohtani H., Tsujimoto M., Murakami H., Koyabu N., Nakamura T., Uchiumi T., Kuwano M., Nagata H., Tsukimori K., Nakano H., Sawada Y. Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005. Vol. 315. P. 888–895. doi: 10.1124/jpet.105.086827
- Sato N., Ito K., Onogawa T., Akahira J., Unno M., Abe T., Niikura H., Yaegashi N. Expression of organic cation transporter SLC22A16 in human endometria. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2007. Vol. 26. P. 53–60. doi: 10.1097/01.pgp.0000225845.67245.b3
- Schmitt B. M., Koepsell H. Alkali cation binding and permeation in the rat organic cation transporter rOCT2. *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 24481–24490. doi: 10.1074/jbc.M414550200
- Schmitt B. M., Gorbunov D., Schlachtbauer P., Egenberger B., Gorboulev V., Wischmeyer E., Müller T., Koepsell H. Charge-to-substrate ratio during organic cation uptake by rat OCT2 is voltage dependent and altered by exchange of glutamate 448 with glutamine. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2009. Vol. 296. P. F709–F722. doi: 10.1152/ajprenal.90323.2008
- Seth P., Wu X., Huang W., Leibach F. H., Ganapathy V. Mutations in novel organic cation transporter (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter, with differential effects on the organic cation transport function and the carnitine transport function. *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 33388–33392.
- Soodvilai S., Nantavishit J., Muanprasat C., Chatsudthipong V. Renal organic cation transporters mediated cadmium-induced nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.* 2011. Vol. 204. P. 38–42. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.04.005
- Schomig E., Spitzenberger F., Engelhard M., Martel F., Ording N., Gründemann D. Molecular cloning and characterization of two novel transport proteins from rat kidney. *FEBS Letters.* 1998. Vol. 425. P. 79–86.
- Srinivas S. R., Prasad P. D., Umapathy N. S., Ganapathy V., Shekhawat P. S. Transport of butyryl-L-carnitine, a potential prodrug, via the carnitine transporter OCTN2 and the amino acid transporter ATB⁰⁺. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007. Vol. 293. P. G1046–G1053.
- Tachampa K., Takeda M., Khamdang S., Noshiro-Kofuji R., Tsuda M., Jariyawat S., Fukutomi T., Sophasan S., Anzai N., Endou H. Interactions of organic anion transporters and organic cation transporters with mycotoxins. *J. Pharmacol. Sci.* 2008. Vol. 106. P. 435–443.
- Tamai I., Yabuuchi H., Nezu J.-I., Sai Y., Oku A., Shimane M. et al. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Letters.* 1997. Vol. 419. P. 107–111.
- Tokuhiro S., Yamada R., Chang X., Suzuki A., Kochi Y., Sawada T., Suzuki M., Nagasaki M., Ohtsuki M., Ono M., Furukawa H., Nagashima M., Yoshino S., Mabuchi A., Sekine A., Saito S., Takahashi A., Tsunoda T., Nakamura Y., Yamamoto K. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 2003. Vol. 35. P. 341–348. doi: 10.1038/ng1267

Tzvetkov M. V., Vormfelde S. V., Balen D., Meineke I., Schmidt T., Sehart D., Sabolic I., Koepsell H., Brockmüller J. The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2009. Vol. 86. P. 299–306. doi: 10.1038/clpt.2009.92

Urban T. J., Brown C., Castro R. A., Shah N., Mercer R., Huang Y., Brett C. M., Burchard E. G., Giacomini K. M. Effects of genetic variation in the novel organic cation transporter, OCTN1, on the renal clearance of gabapentin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007. Vol. 83. P. 416–421. doi: 10.1038/sj.clpt.6100271

Volk C., Gorboulev V., Kotzsch A., Müller T. D., Koepsell H. Five amino acids in the innermost cavity of the substrate binding cleft of organic cation transporter 1 interact with extracellular and intracellular corticosterone. *Mol. Pharmacol.* 2009. Vol. 76. P. 275–289. doi: 10.1124/mol.109.054783

Wang T., Li J., Chen F., Zha Y., He X., Wan D., Gu J. Choline transporters in human lung adenocarcinoma: expression and functional implications. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2007. Vol. 39. P. 668–674.

Wang C., Urayl. P., Mazumdar A., Mayer J. A., Brown P. H. SLC22A5/OCTN2 expression in breast cancer is induced by estrogen via a novel intronic estrogen-response element (ERE). *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. Vol. 134. P. 101–115. doi: 10.1007/s10549-011-1925-0

Winter T. N., Elmquist W. F., Fairbanks C. A. OCT2 and MATE1 provide bidirectional agmatine transport. *Mol. Pharm.* 2011. Vol. 8. P. 133–142. doi: 10.1021/mp100180a

Wu X., Prasad P. D., Leibach F. H., Ganapathy V. cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. Vol. 246. P. 589–595. doi: 10.1006/bbrc.1998.8669

Wu W., Dnyanmote A. V., Nigam S. K. Remote Communication through Solute Carriers and ATP Binding Cassette Drug Transporter Pathways: An Update on the Remote Sensing and Signaling Hypothesis. *Mol. Pharmacol.* 2011. Vol. 79. P. 795–805. doi: 10.1124/mol.110.070607

Zhang L., Dresser M. J., Gray A. T., Yost S. C., Tera-shita S., Giacomini K. M. Cloning and functional expression of a human liver organic cation transporter. *Mol. Pharmacol.* 1997. Vol. 51. P. 913–921.

Zhang X., Shirahatti N. V., Mahadevan D., Wright S. H. A conserved glutamate residue in transmembrane helix 10 influences substrate specificity of rabbit OCT2 (SLC22A2). *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 34813–34822. doi: 10.1074/jbc.M506342200

Zhang T., Xiang C. D., Gale D., Carreiro S., Wu E. Y., Zhang E. Y. Drug transporter and cytochrome P450 mRNA expression in human ocular barriers: implications for ocular drug disposition. *Drug Metab. Dispos.* 2008. Vol. 36. P. 1300–1307. doi: 10.1124/dmd.108.021121

Zhu C., Nigam K. B., Date R. C., Bush K. T., Springer S. A., Saier M. H. Jr., Wu W., Nigam S. K. Evolutionary analysis and classification of OATs, OCTs, OCTNs, and other SLC22 transporters: structure-function implications and analysis of sequence motifs. *Plos ONE*. 2015. P. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0140569

Received May 17, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ:

Смирнов Лев Павлович

ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биохимии, д. б. н. Институт биологии КарНЦ РАН, Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр РАН» ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: levps@rambler.ru
тел.: +79212263211

CONTRIBUTOR:

Smirnov, Lev

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: levps@rambler.ru
tel.: +79212263211

УДК 581.1

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ НА ЕЖЕСУТОЧНЫЕ ПОНИЖЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ИНТЕНСИВНОСТИ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ

Т. Г. Шibaева, Е. Н. Икконен, Е. Г. Шерудило, А. Ф. Титов

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

В обзорной статье представлены собственные и литературные данные о влиянии на растения ежесуточных понижений температуры (ДРОП-воздействий, от англ. *drop* – падение) разной интенсивности и продолжительности. Их анализ показывает, что влияние ДРОП-воздействий на морфологические и физиолого-биохимические показатели теплолюбивых и холодостойких растений в значительной степени зависит от нижнего значения, до которого падает температура. Морфогенетический эффект ДРОП-воздействий, фиксируемый по линейным ростовым показателям, усиливается с понижением температуры, в то время как реакция растений, оцениваемая по другим физиолого-биохимическим параметрам (накопление биомассы, содержание хлорофилла, фотосинтетическая активность, показатели водного режима, холодоустойчивость), в большей степени зависит от того, опускается ли температура ниже критического уровня, что ведет к развитию стресс-реакции. Кроме того, при ДРОП-воздействиях ответная реакция растения в большей степени зависит от абсолютного значения, до которого понижается температура, и продолжительности холодового воздействия, чем от градиента температур, так как именно это определяет запуск комплекса изменений, характерных для стресс-реакции. Продолжительность ДРОП-воздействий становится более важным фактором при снижении температуры до значений, выходящих за пределы оптимума для определенного процесса/показателя. При этом зоны температурного оптимума для разных процессов/показателей (например, рост растений в высоту и время до начала цветения) могут существенно различаться, что определяет как характер, так и эффективность влияния ДРОП-воздействий с определенными параметрами на те или иные процессы/показатели. В большинстве случаев различия в реакции растений на низкотемпературные воздействия разной продолжительности не определяются обычной зависимостью «доза-эффект», так как помимо продолжительности большую роль при этом играет характер температурного воздействия (однократное длительное или непродолжительное ежесуточно повторяющееся (ДРОП-воздействие)). Наконец, эффективность применения ДРОП-воздействий в практических целях в растениеводстве и цветоводстве зависит еще и от видовой (сортовой) принадлежности растений (биологических особенностей вида и сорта), и это предполагает проведение специальных исследований, направленных на выявление оптимальных параметров ДРОП-воздействий применительно к конкретному объекту.

К л ю ч е в ы е с л о в а: низкая температура; растение; рост; развитие; фотосинтез; дыхание; водный режим; холодоустойчивость.

T. G. Shibaeva, E. N. Ikkonen, E. G. Sherudilo, A. F. Titov. PLANT RESPONSES TO A DAILY TEMPERATURE DROP OF DIFFERENT INTENSITY AND DURATION

The review presents own and published data on the effects of a daily temperature drop (DROP) of different intensity and duration on plants. It is concluded that the effect of a temperature drop on morphological, physiological and biochemical characteristics of chilling-sensitive and chilling-tolerant plants depends to a large extent on the absolute value of the lower temperature used for DROP treatments. The morphogenetic effect of DROP treatments, measured by changes in linear growth parameters, increases with the lowering of the temperature used for DROP treatments, while the plant response, estimated by other physiological and biochemical parameters (biomass accumulation, chlorophyll content, photosynthetic activity, water relations indices, chilling tolerance) depends more on whether the temperature falls below the critical level, resulting in a plant stress response. The response of plants to DROP treatments depends more on the absolute value to which the temperature is dropped and on the duration of the chill (since in this case the stress response is triggered in the plant) than on the temperature gradient. The duration of the temperature drop becomes more important when the temperature is lowered to values beyond the optimum range. The optimum temperature ranges for different processes (characteristics) (for example, plant height or time until flowering) can vary significantly, determining the nature and effectiveness of DROP treatments with certain parameters in relation to various processes (characteristics). In most cases, the differences in plant response to DROP treatments of different duration are not determined by the usual dose-effect relationship, since beside the duration, the mode of temperature exposure (single long-term or daily short-term) plays a significant role. In addition, the effectiveness of the DROP treatments of a given intensity and duration for practical purposes in horticulture and floriculture is largely species- (variety-) specific.

Key words: low temperature; plant; growth; development; photosynthesis; respiration; moisture conditions; chilling tolerance.

Введение

Хорошо известно, что каждый вид растений способен существовать и осуществлять свою обычную (нормальную) жизнедеятельность только в определенном диапазоне действующих температур, выход за пределы которого приводит к торможению их роста и развития (вплоть до полной остановки) или даже к гибели растений [Лархер, 1978]. Частые и значительные по амплитуде колебания температуры, наблюдаемые во многих регионах планеты, потребовали от растений выработки в процессе их эволюции различных защитно-приспособительных реакций и адаптационных механизмов, благодаря которым они способны переносить как кратковременные, так и продолжительные отклонения температуры от фоновых (физиологически нормальных) значений. В работах, направленных на изучение устойчивости и адаптации растений к холоду, как правило, исследуют постоянное действие низкой температуры и достаточно длительные экспозиции (сутки и более). Хотя в естественных условиях растения очень часто сталкиваются с ситуацией, когда температура понижается в суточном цикле всего на несколько часов (обычно это происходит ночью), а затем повышается до оптималь-

ных (или близких к ним) значений. В подобной обстановке оказываются не только холодоустойчивые растения, произрастающие в условиях умеренного климата, но и теплолюбивые, выращиваемые в открытом грунте умеренной зоны. Причем в начале и в конце вегетационного сезона они могут испытывать кратковременный холодовой стресс многократно. К примеру, это происходит при ранней высадке рассады томатов (*Solanum lycopersicum* L.) [Dufault, Melton, 1990], дыни (*Cucumis melo* L.), арбузов (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) [Korkmaz, Dufault, 2001a, b, 2004], которая практикуется во многих регионах для получения ранней продукции теплолюбивых культур. Если учесть, что для растений семейства *Cucurbitaceae* (арбуз, дыня) температурный оптимум для роста находится в диапазоне от 20 до 32 °С с минимумом и максимумом соответственно при 18 и 35 °С, то вполне очевидно, что при высадке в марте растения многократно подвергаются действию субоптимальных температур с последующим их повышением до оптимального уровня. Увеличение же количества часов с температурой ниже оптимальной обычно приводит к снижению урожая [Korkmaz, Dufault, 2001a, b, 2004]. Для такого вида, к примеру, как хлопчатник (*Gossypium hirsutum* L.), для которого нестрес-

совыми являются температуры от 23 до 32 °С, избежать повторяющегося холодового стресса в начале или в конце сезона сложно из-за длинного (около 150 дней) вегетационного периода, т. к. в ряде мест традиционного выращивания этой культуры высадка растений обычно производится около 15 мая, а технической зрелости требуется достичь до первых заморозков, которые наблюдаются уже в конце октября [Holaday et al., 2016]. Исследования на холодостойких культурах, таких как морковь (*Daucus carota* subsp. *Sativus* (Hoffm.) Arcang.), салат (*Lactuca sativa* L.) [Currah, 1978], свекла (*Beta vulgaris* L.) [Hegarty, Thompson, 1974] и лук (*Allium* L.) [Henriksen, 1978], также показали, что стресс во время раннего развития снижает урожай.

Помимо ситуаций, наблюдаемых в естественных условиях и описанных выше, теплолюбивые растения могут испытывать кратковременное ежесуточное действие низких температур в теплицах, так как агротехнический прием под названием «temperature drop» (в Европе) и «temperature dip» или «cool morning pulse» (в США) широко применяют с целью управления ростом и получения компактной и более жизнеспособной рассады овощных культур, клумбовых и цветочных растений. Для этого температуру обычно снижают на 5–15 °С на 2–3 ч в конце ночи. Во многих случаях это позволяет полностью или хотя бы частично отказаться от применения химических веществ, обладающих ретардантным эффектом [Мое, 1991; Heins, Erwin, 1991; Erwin, Heins, 1995].

Таким образом, и холодостойкие, и теплолюбивые растения довольно часто оказываются в ситуации ежесуточно повторяющихся непродолжительных понижений температуры (ДРОП-воздействий, от англ. *drop* – «падение»). С одной стороны, ранние сроки посадки предпочтительны для получения более ранней продукции, имеющей более высокую реализационную цену, а с другой, они же увеличивают риск попадания растений под воздействие холодовых стрессов, которые могут иметь серьезные отдаленные последствия, в том числе на урожай. Поэтому изучение влияния ДРОП-воздействий на растения, помимо теоретического, представляет большой практический интерес с точки зрения выявления эффективных и недорогих способов управления ростом растений.

В настоящей статье представлен обзор имеющихся в литературе и собственных данных о зависимости реакции растений на ежесуточные понижения температуры (до значений выше 0 °С) от их интенсивности и продолжи-

тельности в суточном цикле, поскольку выявление наиболее эффективных вариантов ДРОП-воздействий чаще всего связано с этими двумя параметрами ДРОП. В практических целях ДРОП-воздействия применяют как альтернативу ретардантам на протяжении нескольких недель, как правило, в рассадный период или до цветения, а в природе их количество варьирует в широких пределах.

Влияние интенсивности ДРОП-воздействий

Существующие в литературе данные о влиянии ДРОП-воздействий разной интенсивности на растения главным образом касаются влияния на морфогенез растений и сроки цветения, что связано с использованием приема «temperature drop» в практике растениеводства для управления ростом растений [Мое, 1991; Heins, Erwin, 1991; Erwin, Heins, 1995]. Считается, что ДРОП-воздействия со снижением температуры на 5–8 °С (до 14–16 °С) оказывают небольшой (около 10 %) морфогенетический эффект (уменьшение высоты растений/длины междоузлий, длины черешков листьев и цветonoсов, усиление бокового ветвления, изменение ориентации листьев и побегов) на многие виды растений [Myster, Мое, 1995; Мое, Heins, 2000]. Снижение температуры до 2–9 °С на 2 ч значительно увеличивает эффективность ДРОП-воздействий, снижая высоту растений до 50 % по сравнению с контрольными растениями, что было показано на фуксии (*Fuchsia* L.), герани (*Pelargonium* L'Her. Ex Ait.), бегонии (*Begonia* L.) и пуансеттии (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) [Ueber, Hendriks, 1992, 1995; Мое et al., 1995; Jennerich, Hendriks, 1997]. Усиление эффекта ДРОП-воздействий за счет использования более низких температур (12–13 °С по сравнению с 16–19 °С) было также показано на огурце (*Cucumis sativus* L.) [Grimstad, 1993] и бегонии [Grindal, Мое, 1994]. Однако снижение температуры до 8 °С на более продолжительное время (4 ч) приводило к пожелтению листьев и значительной задержке цветения у пуансеттии [Ueber, Hendriks, 1992]. Поэтому сделан вывод, что снижение температуры более чем на 8–9 °С требует специального изучения, прежде чем может быть рекомендовано к практическому применению. У изученных нами видов (огурец, томат, сладкий перец (*Capsicum annuum* L.)) морфологические признаки, характеризующие линейный рост (высота, длина междоузлий и черешков, площадь листьев), уменьшаются с понижением температуры (в диапазоне от 12 до 1 °С), используемой для ДРОП-воздействий [Икконен

и др., 2018; Шибаета и др., 2018]. Предполагается, что влияние ДРОП-воздействий на линейный рост растений обусловлено температурной зависимостью метаболизма гиббереллинов [Moe, Grindal, 2000; Patil et al., 2003]. Другой (или еще одной) возможной причиной торможения роста в длину при ДРОП-воздействиях является их влияние на водный режим растений [Ueber, Hendriks, 1997]. Под воздействием низкой температуры в клетках листьев и стебля падает тургор вследствие снижения скорости поглощения воды корнями и транспирации (но не полного ее прекращения). Пониженный тургор сохраняется не только во время действия низкой температуры, но и в последующий теплый период.

Реакция растений на ДРОП-воздействия по физиолого-биохимическим показателям в большей степени зависит от того, происходят ли нарушения водного режима и развивается ли в результате действия низкой температуры стресс-реакция. Для развития стресс-реакции принципиально важно, опускается ли температура ниже критического уровня (10 °C для видов тропического и субтропического происхождения), т. е. до температуры, при которой у теплолюбивых растений происходит фазовый переход мембран из жидкокристаллического в гель-состояние, приводящий к увеличению проницаемости мембран, нарушению обменных процессов, накоплению токсических веществ, остановке движения цитоплазмы и пр. [Lyons, 1973; Raison, Lyons, 1986; Theocharis et al., 2012; Jones, 2014]. При этом важным фактором является и продолжительность низкотемпературного воздействия. Результаты исследований показали, что применение для ДРОП-воздействий температур из зоны холодого закалывания в диапазоне 8–12 °C оказывается эффективным только в плане уменьшения размеров растений (по отношению к контролю) и увеличения их холодоустойчивости, но практически не сказывается на водном режиме, содержании хлорофилла, фотосинтетической активности, накоплении биомассы [Sysoeva et al., 1999; Марковская и др., 2013; Икконен и др., 2018; Шибаета и др., 2018]. В то же время постоянное круглосуточное действие тех же температур (например, 9 °C) в течение 6 сут практически полностью тормозит рост и развитие растений огурца, инактивирует работу фотосинтетического аппарата (ФСА), увеличивает относительный выход электролитов (ОВЭ) и усиливает перекисное окисление липидов (ПОЛ) [Шибаета и др., 2018]. Постоянное действие температуры 12 °C также вызывает значительное тормо-

жение роста растений в высоту и увеличения площади листьев и снижает, но не инактивирует работу ФСА. Нам представляется, что это связано с тем, что режим выращивания с применением ДРОП-воздействий включает относительно кратковременное (2–3 ч) охлаждение растений с последующим продолжительным (21–22 ч) периодом действия в суточном цикле оптимальной температуры, в течение которого происходит восстановление возможных отклонений и/или нарушений в ФСА, вызванных холодом. Это, в частности, подтверждается данными о снижении величины потенциального (F_v/F_m) и реального ($\Delta F/F_m'$) квантового выхода фотохимической активности ФС II непосредственно во время охлаждения растений и быстром (в течение 1–3 ч) ее восстановлении до уровня контроля после возвращения растений в условия оптимальной температуры. Известно, что инактивация реакционных центров ФС II, приводящая к снижению значений F_v/F_m , может быть обратимой [Gómes et al., 1998]. Также известно, что физиологические нарушения, возникающие в результате изменений, вызванных низкой температурой (фазовый переход липидов мембран, остановка движения цитоплазмы и др.), могут быть обратимыми (reversed) или восстановимыми (repaired), если возврат температуры к норме происходит до того, как произойдут необратимые нарушения и/или повреждения [Lieberman et al., 1958; Creencia, Bramlage, 1971; Jones, 2014]. Интересно, что такого рода обратимость часто наблюдается в естественных условиях, где, к примеру в высокогорных районах тропиков или в Средиземноморье, после каждой холодной ночи наступает теплый день [Franco, 1990; Larcher et al., 2010], а также зафиксирована в лабораторных экспериментах при смене низких и высоких температур в течение короткого периода времени [Wang, Baker, 1979]. Добавим, что прием «периодического нагревания» (intermediate warming) успешно применяется не только для предотвращения холодого повреждения фруктов и овощей при их хранении в условиях низкой температуры [Lyons, 1973; Wang, 1982, 1993; Wang et al., 2012; Aghdam, Vodbodak, 2014], но и препятствует появлению холодого повреждения и снижению скорости фотосинтеза и транспирации у проростков теплолюбивых растений [Koscielniak, Biesaga-Koscielniak, 2000; Skrudlik et al., 2000]. Следовательно, хотя воздействие низкой температурой и способно вызывать многочисленные функциональные и структурные отклонения и/или нарушения, это далеко не всегда приводит к видимым проявлениям произошедших повреждений или ин-

гибированию роста и развития растений, потому что значительная часть этих нарушений могут быть обратимыми или восстановимыми. Кроме того, в период нахождения в условиях оптимальной температуры охлажденные перед этим клетки и ткани листа способны метаболизировать и/или нейтрализовать токсические вещества, которые могли появиться под влиянием ДРОП-воздействий.

Одной из основных причин повреждения теплолюбивых растений при охлаждении, как известно, является активация свободнорадикальных процессов [Лукаткин, 2002]. Усиленная генерация АФК может активировать процесс ПОЛ, который сопровождается накоплением одного из конечных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА). Наши эксперименты показали, что содержание МДА под влиянием ДРОП-воздействий (даже при использовании температур 4 и 1 °С) не увеличивалось. Отсутствие усиления ПОЛ указывает на то, что в данном случае не происходит смещения прооксидантно-антиоксидантного равновесия. ОВЭ из листьев растений, подвергавшихся ДРОП-воздействиям с температурой 8–12 °С, достоверно не отличающийся от контрольных, также свидетельствует об отсутствии нарушения и/или быстром восстановлении целостности мембран клеток при ДРОП-воздействиях умеренной интенсивности [Шибеева и др., 2018]. Кроме того, в случае ДРОП-воздействий растения располагают достаточным временем для накопления энергетических и пластических ресурсов, необходимых для формирования повышенной устойчивости. Поэтому холодоустойчивость листьев при ДРОП-воздействиях с использованием температур от 8 до 12 °С повышалась у всех изученных видов (томат, огурец, сладкий перец, баклажан (*Solanum melongena* L.)).

Применение ДРОП с более низкой температурой (4 и 1 °С) приводило не только к более значительному снижению высоты растений и площади листьев, но и к снижению биомассы растений у огурца [Икконен и др., 2018], тогда как LMA (leaf mass per area) у растений томата и перца даже при этих температурах ДРОП-воздействий не отличались достоверно от контроля. При действии ДРОП с температурой 4 °С у огурца и томата отмечено лишь незначительное снижение содержания хлорофилла, в то время как при действии ДРОП с температурой 1 °С у огурца наблюдалось снижение содержания пигментов на 27 %. Относительное содержание воды (ОСВ) в листьях огурца не отличалось достоверно от контроля при применении ДРОП с температурой 4 °С, но сниже-

ние температуры до 1 °С вызывало небольшое уменьшение ОСВ. Использование таких низких температур (4 и 1 °С) хотя и оказалось менее эффективным в отношении увеличения холодоустойчивости листьев, тем не менее в этих вариантах опыта также наблюдалось повышение холодоустойчивости листьев по сравнению с контролем, т. е. когда температура понижалась на 2–3 ч до повреждающих значений, определенных ранее [Дроздов и др., 1984] как ниже 7 °С для огурца и перца и ниже 5 °С для томата. Очевидно, что при ДРОП-воздействиях абсолютные значения повреждающих температур отличаются от тех, которые вызывают повреждение растений при их постоянном длительном действии.

Отклик растений на ДРОП-воздействия в диапазоне от 12 до 1 °С, оцениваемый по скорости фотосинтеза и дыхания, зависел не только от температуры, используемой для ДРОП-воздействий, но и от видовой принадлежности растений. У огурца тенденция к снижению скорости фотосинтеза при насыщающем фотосинтезе прослеживалась начиная с температуры ДРОП-воздействий 8 °С [Икконен и др., 2018]. Но достоверное снижение у всех исследованных видов (огурец, томат, сладкий перец) отмечено только при более низкой температуре ДРОП (4 °С) и составило по отношению к контролю 23, 22 и 10 % для огурца, томата и перца соответственно. Отметим также, что ДРОП инициировал закрывание устьиц в большей степени у растений огурца, чем у томата и перца, при этом степень снижения устьичной проводимости находилась в прямой зависимости от температуры, используемой для ДРОП-воздействий [Икконен и др., 2018]. В отличие от томата растения огурца и перца реагировали на ДРОП-воздействия снижением видимого квантового выхода фотосинтеза, но более выраженным у огурца [Икконен и др., 2018]. У огурца и томата ДРОП-воздействия вызвали последовательное повышение величины светового компенсационного пункта (СКП) по мере снижения температуры воздействия с 12 до 1 °С. Ее увеличение могло быть связано с ростом интенсивности дыхания листьев под влиянием ДРОП.

Анализ изменения соотношения темнового дыхания листьев (R_d) к gross-фотосинтезу (A_g) (R/A) (показатель сбалансированности у растения основных физиологических процессов [Рахманкулова, 2002]), уменьшение которого является предпосылкой накопления фотоассимилятов [Климов, 2003]) под влиянием ДРОП-воздействий, показал, что оно увеличивается у растений огурца и томата, при этом величина

изменения у огурца возрастает с усилением интенсивности ДРОП, то есть со снижением значения действующей на растения температуры [Икконен и др., 2018]. Увеличение под влиянием ДРОП-воздействий величины R_d/A_g на уровне листа было обусловлено в большей степени повышением R_d и в меньшей степени – снижением A_g . Важно, что в случае ДРОП-воздействий абсолютные значения температур, приводящие к увеличению R/A , оказываются значительно ниже тех, которые при длительном воздействии температуры приводят к фотоингибированию и возрастанию скорости дыхания, а следовательно, к росту R/A . В целом ряде работ показано, что в диапазоне умеренных температур (15–25 °С) адаптационные изменения ведут к восстановлению соотношения R/A [Gifford, 1995; Dewar et al., 1999; Loveys et al., 2002, 2003; Atkin et al., 2005, 2006], но при действии температур за пределами этого диапазона постоянство соотношения R/A не сохраняется [Campbell et al., 2007]. Это говорит о том, что при ДРОП-воздействиях температурный диапазон, в пределах которого растения способны поддерживать на определенном уровне соотношение R/A (и, соответственно, скорость накопления сухой биомассы), оказывается значительно шире, чем в случае постоянного длительного действия низких температур.

Хорошо известно, что у каждого вида есть свой диапазон оптимальных температур, причем для разных процессов (рост, цветение, плодоношение и др.) имеются свои диапазоны оптимума. Так, например, для индукции цветения и ранних процессов развития у пуансеттии такой диапазон включает температуры от 16 до 22 °С. Поэтому умеренное снижение температуры до 16 °С на 2 или 4 ч в сутки не оказывает влияния на сроки цветения [Ueber, Hendriks, 1992]. В то же время длина стебля у пуансеттии линейно увеличивается в диапазоне от 14 до 26 °С. Поэтому даже снижение температуры до 16 °С на 2 ч, приводящее к снижению дневной температуры на 1,6 °С и среднесуточной температуры всего на 0,7 °С, оказывает на высоту растений хоть и небольшой (9 %), но ожидаемый эффект [Ueber, Hendriks, 1992]. В противоположность этому, объяснить эффекты ДРОП-воздействий большой интенсивности с помощью дневных и среднесуточных температур не удастся. Так, 2- и 4-часовые ДРОП-воздействия с температурой 8 °С по расчетам, основанным на снижении среднесуточной температуры, должны были бы привести к уменьшению длины стебля на 11 и 21 % соответственно, а в действительности снижение составляло гораздо больше – 44 и 72 % [Ueber, Hendriks,

1992]. При большем снижении температуры, когда происходит выход за пределы того диапазона, где возможно сохранение сбалансированности процессов, возникают побочные негативные эффекты, которые не могут быть компенсированы в течение последующего теплого периода [Levitt, 1980].

Результаты наших исследований, проведенных на холодостойких растениях – пшенице (*Triticum aestivum* L.) и цветной капусте (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* L.), показали, что более выраженные эффекты ДРОП наблюдаются при действии более низких закалывающих температур, близких к повреждающим не только у теплолюбивых, но и у холодостойких растений. Так, у пшеницы действие ДРОП с температурой 12 °С не вызывает достоверных изменений ни морфологических, ни физиолого-биохимических показателей. В то же время под влиянием ДРОП с температурой 2 °С у пшеницы наблюдалось торможение скорости роста растений в высоту, уменьшение сухого веса растений, содержания хлорофилла, F_v/F_m , и при этом снижались значения ОВЭ, усиливалось митохондриальное дыхание листьев и повышалась холодоустойчивость листьев. Следует, однако, отметить, что уже через 1 сут после окончания ДРОП-воздействий значения F_v/F_m не различались у контрольных растений и тех, которые были подвержены ДРОП-воздействиям. Прирост холодоустойчивости листьев пшеницы был выше при действии ДРОП с температурой 4 °С, чем 12 °С. У растений цветной капусты ДРОП-воздействия с температурой 4 и 1 °С оказывали морфогенетический эффект, вызывая сокращение длины черешков и площади листьев, приводили к уменьшению ОВЭ и увеличению холодоустойчивости, но не влияли на содержание хлорофилла и значения F_v/F_m . Заметим, что некоторые клумбовые растения откликаются уменьшением высоты и компактностью только на очень сильные ДРОП-воздействия (снижение температуры до 2–4 °С), что ограничивает их практическое применение ввиду трудности достижения столь низкой температуры в теплице [Мое, Heins, 2000]. При кратковременном применении повреждающих (отрицательных) температур для холодостойких растений не обнаруживается повышения их холодо- или морозоустойчивости [Марковская и др., 2013].

Влияние продолжительности ДРОП-воздействий

Считается, что воздействие низких положительных температур на растение должно быть

достаточно длительным, чтобы поврежденными оказались клетки у большинства даже самых чувствительных к холоду растений. Чаще всего для проявления симптомов холодого повреждения требуются дни или даже недели низкотемпературного воздействия, хотя для некоторых растений (*Episcia*, *Achimenes*, *Gloxinia*) описаны симптомы холодого повреждения после всего нескольких часов нахождения растений при температуре от 1 до 5 °C [Levitt, 1980].

В работах, посвященных изучению эффектов ДРОП-воздействий на растения, чаще всего используют 2-часовые воздействия. Увеличение продолжительности ДРОП-воздействий до 4 ч и более, как показывают исследования, приводит к разным результатам. В ряде работ показано усиление эффектов низкой температуры (а именно большее торможение роста, уменьшение площади листьев, биомассы растений, задержка цветения и снижение урожайности) с увеличением продолжительности воздействия [Ueber, Hendriks, 1992; Мое, 1992; Tutty et al., 1994; Ihlebekk et al., 1995; Vogelezang, 1995; Korkmaz, Dufault, 2001a, b, 2004], при этом степень влияния усиливается с понижением температуры, используемой для ДРОП-воздействий. Так, высота растений пуансеттии уменьшалась на 9–26 % в зависимости от продолжительности снижения (2, 4 или 8 ч) при снижении температуры с 24 до 16 °C и на 44–81 % при снижении температуры до 8 °C. При этом при 2- и 4-часовых ДРОП-воздействиях с использованием температуры 16 °C не выявлено изменений площади и количества листьев, сырого и сухого веса растений. При использовании температуры 8 °C изменения этих же показателей были достоверными уже при 2-часовых ДРОП-воздействиях, и их эффект усиливался с увеличением продолжительности до 8 ч [Ueber, Hendriks, 1992]. Интересно, что развитие стрессовой реакции в ответ на ДРОП-воздействия с температурой 8 °C наблюдали сразу же после перенесения растений на холод – они начинали вянуть, а у растений, подвергавшихся холоду более 4 ч, желтели листья. Но по окончании ДРОП-воздействий цвет листьев восстанавливался [Ueber, Hendriks, 1992]. Высота герани не менялась при снижении температуры с 18 до 12 °C на 2 ч [Hendriks, 1991], но уменьшалась при 3-часовом воздействии [Мое, 1992]. Также не изменялась скорость роста стебля под влиянием 2-часовых ДРОП-воздействий (снижение с 18,3 до 8,3 °C) у хризантемы (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.), но снижалась при увеличении их продолжительности до 4, 6, 8

или 11 ч [Tutty et al., 1994]. У фуксии и герани 8-часовой ДРОП был более эффективным, чем 4-часовой [Vogelezang, 1995].

В ряде работ показано, что усиление эффектов низкой температуры с увеличением продолжительности ее действия происходит только до определенного предела, выше которого увеличение продолжительности периодов действия пониженной температуры не приводит к соответствующим изменениям. Например, высота растений колокольчика (*Campanula isophylla* Moretti) равномерно уменьшалась по сравнению с контролем при увеличении продолжительности ДРОП-воздействий от 3 до 9 ч при сохранении постоянной среднесуточной температуры, но дальнейшее увеличение низкотемпературного воздействия до 12 ч не приводило к большему торможению роста [Ihlebekk et al., 1995]. У бегонии (*Begonia* × *hiemalis* Fotsch.) и бальзамина (*Impatiens shawkeri* W. Bull) высота растений уменьшалась примерно одинаково при 4- и 8-часовом снижении температуры в дневное время [Vogelezang, 1995]. У томата и огурца, напротив, увеличение продолжительности ДРОП-воздействий с 2 до 4 и 6 ч вело к меньшему влиянию на длину стебля [Grimstad, 1995; Sysoeva et al., 1997]. Аналогично у петунии (*Petunia* Juss) и каланхоэ (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.) при увеличении продолжительности ДРОП-воздействий с 1,5 до 3 ч эффект снижался [Mortensen, Мое, 1992].

Таким образом, в зависимости от продолжительности ДРОП-воздействий скорость роста растений может снижаться, не меняться или даже увеличиваться. По мнению ряда исследователей [Мое et al., 1995], столь разная реакция разных видов растений на продолжительность ДРОП-воздействий может быть связана с их принадлежностью к разным фотопериодическим группам. Как показали исследования, у большинства короткодневных растений, таких как пуансеттия, бегония и др., ДРОП-воздействия небольшой продолжительности (2–3 ч) эффективно тормозят рост растений в высоту, тогда как длиннодневным растениям (колокольчик, петуния, Melissa (*Melissa officinalis* L.) и др.) для уменьшения высоты нужны более длительные (6–9 ч) низкотемпературные воздействия [Mortensen, Мое, 1992; Мое et al., 1995]. Хотя и в этом случае есть исключения. Например, короткодневное растение каланхоэ имело наименьшую высоту в варианте опыта с одинаковой дневной и ночной температурой, а при действии градиентных температур (17/20 °C) или ДРОП-воздействий (с 20 до 14 °C на 2 ч) высота растений была больше [Mortensen, Мое, 1992]. Кроме того,

эксперименты, проведенные на 19 различных видах и сортах растений (*Begonia* × *hiemalis*, *Begonia* × *tuberhybrida pendula*, *Calceolaria* × *herbeohybrida*, *Fuchsia* × *hybrida*, *Impatiens walleriana*, *Kalanchoe blossfeldiana*, *Pelargonium* × *hortorum*, *Petunia* × *hybrida* (3 сорта), *Rosa* sp. (4 сорта), *Salvia splendens*, *Senecio cruentus*, *Sinningia speciosa*, *Tagetes patula nana*, *Verbena elegans*), показали, что эффективность ДРОП-воздействий может в значительной мере зависеть от фотопериода. Так, в условиях длинного фотопериода (16 ч) 1,5- и 3-часовые ДРОП-воздействия (12 °С) слабо влияли на высоту изучаемых растений [Mortensen, Moe, 1992].

В отношении возможного влияния продолжительности ДРОП-воздействий на накопление сухой биомассы растений имеющиеся данные весьма противоречивы и варьируют в зависимости от вида, сорта, а также сопутствующих условий, в частности фотопериода. В условиях длинного фотопериода у *Pelargonium* × *hortorum* L. H. Bailey сухая масса снижалась под влиянием 1,5-часового ДРОП, но увеличивалась при 3-часовых ДРОП-воздействиях у растений одного сорта, размноженных путем черенкования, а у растений другого сорта, выращенных из семян, и 1,5- и 3-часовые ДРОП-воздействия снижали биомассу. У розы 1,5-часовой ДРОП увеличивал накопление биомассы, в то время как 3-часовой ДРОП снижал ее [Mortensen, Moe, 1992]. У колокольчика 3-часовой ДРОП не изменял биомассу растения (рассчитанную на 1 см высоты растения), а увеличение продолжительности холодового воздействия до 6–12 ч приводило к ее увеличению по сравнению с контролем [Ihlebekk et al., 1995; Moe et al., 1995]. У дыни и арбуза увеличение продолжительности ДРОП-воздействий (2 °С) с 3 до 6 и 9 ч приводило к большему уменьшению сухого веса и площади листьев, задержке цветения и снижению урожая [Korkmaz, Dufault, 2001a, b, 2004]. У растений огурца 2–3-ч снижение температуры до 12 °С приводило к небольшому уменьшению биомассы растений, тогда как при снижении температуры на 4–6 ч биомасса растений была сопоставима с контролем, а при снижении температуры на 12 ч биомасса значительно уменьшалась [Sysoeva et al., 1997; Марковская и др., 2013].

Что касается влияния ДРОП-воздействий на сроки цветения, то такого рода данные также противоречивы. У пуансеттии при снижении температуры с 24 до 16 °С на 2 или 4 ч изменений сроков цветения не происходило, а 8-часовые снижения задерживали появление бутонов на 4 дня. При этом если температуру снижали более чем на 4 ч до 8 °С, наблюдалась сильная

задержка цветения и хлороз листьев [Ueber, Hendriks, 1992]. У растений колокольчика 3-часовые ДРОП-воздействия несколько (на 3 сут) сокращали время до начала цветения, а более длительные понижения температуры (6, 9, 12 ч) приводили к задержке цветения на 3–6 сут, при том, что в этих экспериментах во всех вариантах опыта сохранялась одинаковая среднесуточная температура [Ihlebekk et al., 1995; Moe et al., 1995]. У некоторых видов (*Begonia* × *tuberhybrida pendula*, *Impatiens walleriana*, *Kalanchoe blossfeldiana*, *Pelargonium* × *hortorum*, *Petunia* × *hybrida*), напротив, 1,5-часовые ДРОП-воздействия (12 °С) сокращали время до цветения на 3–9 дней по сравнению с контролем, а 3-часовые ДРОП-воздействия не оказывали подобного эффекта [Mortensen, Moe, 1992]. У томата снижение температуры на 6 и 9 °С вызывало задержку цветения, но только тогда, когда продолжительность ДРОП-воздействий достигала 4–5 ч. Если же ДРОП-воздействия были короче или температура выше, то уменьшение высоты растений не сопровождалось задержкой цветения [Grimstad, 1993]. На растениях хризантемы (*Chrysanthemum carinatum* Schoubs), бархатцев (*Tagetes erecta* L.) и петунии (*Petunia* × *hybrida*) было показано, что для ускорения цветения у короткодневного (хризантема) и нейтральнодневного (бархатцы) видов было достаточно 2-часовых ДРОП-воздействий, а для длиннодневного (петуния) цветение ускорялось 6-часовыми ДРОП-воздействиями [Марковская и др., 2013].

Опыты с ДРОП-воздействиями разной продолжительности (2, 4 и 12 ч) с сохранением суммы температур (2 ч 6-кратно, 4 ч 3-кратно и 12 ч однократно) показали, что результат влияния снижения температуры на биометрические показатели и холодоустойчивость листьев огурца больше зависит от количества низкотемпературных воздействий, чем от их продолжительности (по крайней мере в диапазоне от 2 до 12 ч) [Шибарева и др., 2018]. Так, высота и сухой вес растений, длина черешков и площадь листьев снижались, а холодоустойчивость повышалась больше в результате 6-кратного 2-часового понижения температуры по сравнению с 3-кратным 4-часовым или однократным 12-часовым. Различия в реакции растений на низкотемпературные воздействия разной продолжительности, как показывает этот опыт, не определяются обычной зависимостью «доза-эффект», так как «общая (суммарная) доза» низкой температуры во всех вариантах опыта была одинаковой. Большую роль играет характер температурного воздействия (длительное или кратковременное, постоянное однократное

или периодически повторяющееся). По всей видимости, это объясняется существованием суточной ритмики чувствительности растений к холоду, выявленной в ряде работ на теплолюбивых видах, в том числе на огурце [King et al., 1982; Alscher et al., 1988; Rietze, Wiebe, 1989; Grimstad, 1993]. Установлено, что в суточном цикле периоды максимальной скорости роста и наибольшей чувствительности к холоду весьма непродолжительны и не совпадают по времени. Поэтому за счет однократного снижения температуры на 12 ч ночью нельзя достичь того же эффекта, как при 6-кратном ее снижении на 2 ч.

В литературе нет единого мнения относительно механизмов, определяющих различные результаты влияния ДРОП-воздействий разной продолжительности на те или иные биометрические или физиологические показатели растений. Часть эффектов можно объяснить снижением среднесуточной температуры и суммы температур при применении ДРОП-воздействий. Поскольку удлинение стебля и время до начала цветения у многих культур находятся в прямой зависимости от среднесуточной температуры [Myster, Moe, 1995], то, вероятно, это может объяснить задержку цветения у эуфорбии при длительных (8 ч) снижениях температуры до 16 °С и еще большую задержку при непродолжительных (4 ч), но интенсивных (до 8 °С) снижениях температуры [Ueber, Hendriks, 1992]. Однако из полученных нами данных и анализа результатов опытов с сохранением одинаковой среднесуточной температуры следует, что объяснить влияние ДРОП-воздействий на линейный рост, накопление биомассы и время до начала цветения только снижением среднесуточной температуры невозможно. Например, у растений колокольчика задержка цветения происходила при снижении температуры на 3, 6, 9 и 12 ч при одинаковой среднесуточной температуре во всех вариантах опыта [Ihlebekk et al., 1995; Moe et al., 1995]. Кроме того, у некоторых культур, например томата, скорость развития цветков увеличивается в определенном диапазоне с понижением среднесуточной температуры [Ohyama et al., 2005]. В наших опытах на огурце мы наблюдали торможение линейного роста и накопления биомассы растений при понижениях температуры на 2, 4 и 6 ч при одинаковой среднесуточной температуре [Sysoeva et al., 1997].

Когда с увеличением продолжительности низкотемпературных воздействий возрастает их эффект, то это вполне ожидаемо и объяснимо. В частности, предполагается, что это связано с особенностями температурной за-

висимости метаболизма гиббереллинов [Moe, Grindal, 2000; Patil et al., 2003] и/или с нарушениями водного режима растений [Ueber, Hendriks, 1997], так как одной из причин торможения роста в длину при ДРОП-воздействиях является их влияние на водный режим растений (падение тургора вследствие снижения скорости поглощения воды и уменьшения, но не полного прекращения транспирации, сохраняющееся не только во время действия низкой температуры, но и в последующий теплый период). Гораздо сложнее объяснить те случаи, когда более кратковременные ДРОП-воздействия оказываются более эффективными, например, в отношении торможения роста, чем более длительные. Одним из возможных объяснений такого явления может быть ситуация, когда в тканях растений создается резерв поделившихся, но не растянувшихся клеток [Harrison et al., 1998]. Дело в том, что клетки на разных фазах роста отличаются по чувствительности к холоду. Процесс растяжения клеток более чувствителен к низкой температуре, чем деление клеток [Miedema, 1982; Лукаткин и др., 2010]. Поэтому при снижении температуры скорость растяжения клеток снижается быстрее, чем скорость их деления. Таким образом, при повышении температуры до значений, позволяющих возобновиться растяжению клеток, может происходить «вспышка роста» за счет накопившихся нерастянувшихся клеток. Возможно, это и происходит при ДРОП-воздействиях в определенных условиях, что приводит к неожиданному отсутствию негативного влияния понижений температуры на конечные размеры растений и даже к некоторым фактам «парадоксального» увеличения высоты растений после низкотемпературных воздействий.

Продолжительность ДРОП-воздействия в суточном цикле определяет еще и время, которое остается на восстановление и репарацию. Чем больше период действия низкой температуры, тем, соответственно, меньше времени растение находится в теплых условиях, когда возможен возврат к оптимальному (обычному) метаболизму. Скорость ингибирования и восстановления у разных процессов неодинаковая и сильно варьирует между видами. Так, например, показано, что после инактивации комплексов ФС II у хлопчатника при действии температуры 15 °С на свету полное восстановление значений F_v/F_m может занимать при температуре 28 °С 2 сут [Perera et al., 1995]. В то же время имеются работы, где описано отсутствие изменений в значениях F_v/F_m и скорости фотосинтеза у огурца в первые 2 ч действия температуры 4 °С на свету и в первые 12 ч ее действия в тем-

ноте. Правда, в дальнейшем происходит резкий спад – скорость фотосинтеза падает на 50 и 90 % соответственно через 4 и 6 ч на свету и до тех же значений через 24 и 48 ч в темноте [Sonoike, 2006]. На примере *Dendranthema grandiflorum* показано, что восстановление скорости роста после снижения температуры с 18,3 до 8,3 °С на 2 ч происходит примерно за 1 ч после завершения низкотемпературного воздействия [Tutty et al., 1994]. В целом известно, что чем более сильные нарушения/повреждения наблюдаются в результате холодового стресса, тем медленнее происходит возобновление роста в последующий теплый период [Stoddart et al., 1986]. Как уже отмечалось, во время теплого периода в суточном цикле растения могут восстанавливать возникшие под влиянием кратковременного охлаждения нарушения и/или повреждения, метаболизировать и/или нейтрализовать накопившиеся под действием холода токсические вещества. Кроме того, в этом случае растения располагают достаточным временем для пополнения энергетических и пластических запасов, необходимых для формирования повышенной устойчивости. Например, показано, что если молодые растения кукурузы (*Zea mays* L.), растущие при температуре 5 °С, помещать хотя бы на 1 ч (а лучше на 4 ч) в сутки в условия субоптимальной температуры 14 °С, то это значительно снижает степень индуцированных холодом нарушений водного режима, уменьшение фотохимической эффективности ФС II, ингибирование фотосинтеза и относительную скорость роста, а также сокращает выход электролитов [Koscielniak, Biesaga-Koscielniak, 2000]. Отсюда следует вывод, что в весенний период даже непродолжительные периоды тепла на фоне низких температур в суточном цикле позволяют растениям, в частности кукурузе, избежать неблагоприятных последствий холода, и это в результате благоприятно сказывается на урожае.

В естественных условиях многие теплолюбивые культуры, выращиваемые в районах с умеренным климатом на огромных площадях в открытом грунте (кукуруза, рис (*Oryza sativa* L.), хлопчатник, дыня, арбуз и др.), довольно часто в начале сезона, а иногда и в его конце, оказываются в ситуации ежедневно повторяющихся непродолжительных понижений температуры. Изучение влияния ДРОП-воздействий различной продолжительности необходимо, так как служит важным ориентиром для определения оптимального времени посадки многих культур. Например, многолетние наблюдения (с 2003 по 2015 гг.) при выращивании хлопчат-

ника в центральной части США (в штате Техас) показали, что на орошаемых полях на плато Высокие равнины (High Plains) (33°35' с. ш. 101°53' з. д.) при посадке в апреле растения испытывают холодовой стресс (температура ниже 12 °С) в среднем в течение 2,7–9,2 ч/сут в первый месяц (всего 81–276 ч), при посадке в мае – 0,8–3,6 ч/сут (всего 24–113 ч), а при посадке в июле – 0,2–0,5 ч/сут (всего 0–17 ч) [Holaday et al., 2016]. При этом растения, посаженные в апреле, в конце вегетационного сезона подвергаются действию температур ниже 12 °С в среднем в течение 0–0,2 ч/сут (всего 0,5–5,6 ч), в мае – 0–1,1 ч/сут (всего 0–35 ч), в июне – 3,5–9,6 ч/сут (всего 107–290 ч). Поэтому очевидно, что сроки посадки растений зависят от того, какой длительности понижения температуры растения могут переносить в начале и в конце вегетационного сезона без ущерба для урожая. Этому вопросу посвящены многочисленные исследования на разных культурах [Bradow, 1991; Payton et al., 2001; Korkmaz, Dufault, 2001a, b, 2004; Bange, Milroy, 2004; Sofalian et al., 2013], хотя применение результатов, полученных в контролируемых условиях, по мнению агрономов [Holaday et al., 2016], имеет большие ограничения для прогнозирования реакции растений на холод в полевых условиях.

Заключение

Как показывают результаты исследований, влияние ежесуточных непродолжительных понижений температуры на морфологические и физиолого-биохимические показатели теплолюбивых и холодостойких растений в значительной степени зависит от нижних значений, до которых при этом опускается температура. Морфогенетический эффект ДРОП-воздействий, фиксируемый по линейным ростовым показателям (высота растений, длина междоузлий и черешков листьев, размеры листьев), усиливается с понижением температуры, в то время как реакция растений, оцениваемая по другим физиолого-биохимическим параметрам (накопление биомассы, содержание хлорофилла, фотосинтетическая активность, ОСВ, ОВЭ, интенсивность ПОЛ, холодоустойчивость) в большей степени зависит от того, опускается ли температура ниже критического уровня и развивается ли под ее влиянием стресс-реакция. Более выраженные эффекты ДРОП-воздействий (торможение роста и накопления биомассы, повышение холодоустойчивости, снижение скорости фотосинтеза и усиление дыхания растений) наблюдаются при исполь-

зовании низких закаливающих температур, близких к повреждающим или даже относящихся к повреждающим (в случае их непрерывного и достаточно продолжительного действия на растения). При этом важно иметь в виду, что при ДРОП-воздействиях ответная реакция растения в большей степени зависит от абсолютного значения, до которого понижается температура, и продолжительности холодового воздействия, чем от градиента температур, так как именно этим определяется, запускается ли в данном случае комплекс изменений, характерных для стресс-реакции.

Границы температурных зон (зоны холодового закаливания и зоны холодового повреждения), установленные ранее в опытах с постоянным продолжительным (несколько суток) действием низких температур [Дроздов и др., 1984; Drozdov et al., 1984a, b; Акимова и др., 1985; Титов и др., 1987, 2003], не являются абсолютными, а зависят, как подчеркивают авторы этих работ, от многих факторов (фазы развития растений, их физиологического состояния, параметров внешней среды). Под влиянием ДРОП-воздействий эти границы могут существенно смещаться в область более низких температур, что необходимо учитывать при выборе значений температуры в экспериментах, направленных на решение тех или иных задач. Важно и то, что при ДРОП-воздействиях диапазон, в пределах которого растения способны поддерживать соотношение R/A на определенном уровне (что отражает сбалансированность у растения основных физиологических процессов и способность накапливать в достаточных количествах фотоассимиляты), оказывается значительно шире, чем в случае постоянного длительного действия на них низких температур.

При одинаковой «суммарной дозе» ДРОП-воздействий более короткие, но интенсивные ежесуточные воздействия (например, 8 °С в течение 2 ч) оказывают более сильный эффект на морфологические и физиолого-биохимические показатели, чем более продолжительные умеренные (например, 16 °С в течение 8 ч). Это связано с тем, что падение температуры до значений ниже критического уровня вызывает дополнительные эффекты, связанные с продолжительным последствием на растения охлаждения, которые не могут быть быстро компенсированы в теплых условиях. Кроме того, в большинстве случаев различия в реакции растений на низкотемпературные воздействия разной продолжительности не определяются обычной зависимостью «доза-эффект», так как помимо продолжительности

в этом случае большую роль играет сам характер температурного воздействия (длительное или кратковременное, постоянное однократное или периодически повторяющееся).

Продолжительность ДРОП-воздействий приобретает особенно важную роль при снижении температуры до значений, выходящих за пределы оптимума для конкретного процесса/показателя. При этом зоны температурного оптимума для разных процессов/показателей (например, рост растений в высоту и время до начала цветения) могут существенно различаться, что определяет эффективность влияния ДРОП-воздействий с определенными параметрами на те или иные процессы/показатели. Наконец, следует иметь в виду, что эффективность применения ДРОП-воздействий с заданными параметрами в практических целях (в растениеводстве и цветоводстве) во многом зависит и от видовой принадлежности растений (т. е. их биологических особенностей), и это предполагает проведение специальных исследований, направленных на выявление оптимальных параметров ДРОП-воздействий применительно к каждому конкретному объекту.

Добавим, что помимо двух указанных выше параметров ДРОП-воздействий – интенсивность и продолжительность, которым посвящена данная статья, эффективность их применения может также изменяться в зависимости от скорости снижения температуры [Шиббаева и др., 2016] и времени суток, когда они применяются [Grindal, Moe, 1995; Grimstad, 1995; Sysoeva et al., 1997, 1999].

В целом совокупность собственных и литературных данных позволяет считать, что реакция растений на кратковременные ежесуточные понижения температуры – ДРОП-воздействия – обладает своей очевидной спецификой, которая прежде всего обусловлена тем, что при данном типе низкотемпературных воздействий периоды, когда охлаждение запускает в клетках и тканях растений программу адаптационных изменений, сопряженную с торможением роста и развития, чередуются в суточном цикле с более продолжительными периодами действия оптимальной температуры, при которой происходит переключение программ и возобновляется рост и реализация онтогенетической программы [Шиббаева и др., 2018]. Поэтому при правильном подборе температуры для ДРОП-воздействий, их продолжительности в суточном цикле и количестве повторов (кратности) появляется возможность с помощью данного приема управлять ростом тепличных растений и улучшать их качество.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» при финансовой поддержке из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0221-2017-0051).

Литература

- Акимова Т. В., Дроздов С. Н., Умаров Х. У., Курец В. К. Влияние температуры на формирование холодо- и теплоустойчивости хлопчатника // Докл. АН Узб. ССР. 1985. № 4. С. 53–54.
- Дроздов С. Н., Курец В. К., Титов А. Ф. Терморезистентность активно вегетирующих растений. Л.: Наука, 1984. 168 с.
- Икконен Е. Н., Шибаева Т. Г., Титов А. Ф. Влияние кратковременных ежесуточных понижений температуры на соотношение дыхания и фотосинтеза у теплолюбивых растений // Физиология растений. 2018. Т. 65, № 1. С. 63–69. doi: 10.7868/S0015330318010050
- Климов С. В. Холодовое закаливание растений – результат поддержания повышенного отношения фотосинтез/дыхание при низких температурах // Известия АН. Сер. биол. 2003. № 1. С. 57–62.
- Лархер В. Экология растений. М.: Мир, 1978. 185 с.
- Лукаткин А. С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. 208 с.
- Лукаткин А. С., Шаркаева Э. Ш., Апарин С. В. Ростовые реакции клеток конуса нарастания теплолюбивых растений при действии и последствии пониженных температур // Физиология и биохимия культ. растений. 2010. Т. 42, № 3. С. 256–269.
- Марковская Е. Ф., Сысоева М. И., Шерудило Е. Г. Кратковременная гипотермия и растение. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2013. 194 с.
- Рахманкулова З. Ф. Взаимосвязь фотосинтеза и дыхания целого растения в норме и при неблагоприятных внешних условиях // Журнал общей биологии. 2002. Т. 63. № 3. С. 44–53.
- Титов А. Ф., Дроздов С. Н., Акимова Т. В., Таланова В. В. Исследование реакции растений сои на действие температуры. Границы температурных зон // Физиология растений. 1987. Т. 34, № 2. С. 350–355.
- Титов А. Ф., Акимова Т. В., Балагурова Н. И., Таланова В. В., Топчиева Л. В., Шерудило Е. Г. Устойчивость активно вегетирующих растений к низким и высоким температурам. I. Закономерности варьирования устойчивости // Наземные и водные экосистемы Северной Европы: управление и охрана: Матер. между. конф., посвящ. 50-летию ИБ КарНЦ РАН. Петрозаводск, 2003. С. 138–144.
- Шибаева Т. Г., Шерудило Е. Г., Титов А. Ф. Особенности реакции растений *Cucumis sativus* L. на ДРОП в зависимости от скорости снижения температуры // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 7. С. 121–127. doi: 10.17076/eb489
- Шибаева Т. Г., Шерудило Е. Г., Титов А. Ф. Реакция растений *Cucumis sativus* L. на длительное постоянное и кратковременные ежесуточные воздействия низких температур // Физиология растений. 2018. Т. 65, № 2. С. 143–152. doi: 10.7868/S0015330318020069
- Aghdam M. S., Bodbodak S. Postharvest heat treatment for mitigation of chilling injury in fruits and vegetables // Food Bioprocess Technol. 2014. Vol. 7. P. 37–53. doi: 10.1007/s11947-013-1207-4
- Alscher G., Rietze E., Wiebe H.-J. Diurnal chilling sensitivity of some vegetable crops // Biotronics. 1988. Vol. 17. P. 17–20
- Atkin O. K., Bruhn D., Hurry V. M., Tjoelker M. G. The hot and the cold: unraveling the variable response of plant respiration to temperature // Funct. Plant Biol. 2005. Vol. 32. P. 87–105. doi: 10.1071/FP03176
- Atkin O. K., Scheurwater I., Pons T. L. High thermal acclimation potential of both photosynthesis and respiration in two lowland *Plantago* species in contrast to an alpine congeneric // Global Change Biology. 2006. Vol. 12. P. 500–515. doi: 10.1111/j.1365-2486.2006.01114
- Bange M. P., Milroy S. P. Growth and dry matter partitioning of diverse cotton genotypes // Field Crops Res. 2004. Vol. 87, no. 1. P. 73–87. doi: 10.1016/j.fcr.2003.09.007
- Bradov J. M. Cotton cultivar responses to suboptimal postemergent temperatures // Crop. Sci. 1991. Vol. 31. P. 1595–1599. doi: 10.2135/cropsci1991.0011183X003100060043x
- Campbell C., Atkinson L., Zaragoza-Castells J., Lundmark M., Atkin O., Hurry V. Acclimation of photosynthesis and respiration is asynchronous in response to changes in temperature regardless of plant functional group // New Phytol. 2007. Vol. 176, no. 2. P. 375–389. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02183.x
- Creencia R. P., Bramlage W. J. Reversibility of chilling injury to corn seedlings // Plant Physiol. 1971. Vol. 47. P. 389–392. doi: 10.1104/pp.47.3.389
- Currah I. Plant uniformity at harvest related to variation between emerging seedlings // Acta Hort. 1978. Vol. 72. P. 57–68. doi: 10.17660/ActaHortic.1978.72.6
- Dewar R. C., Medlyn B. E., McMurtrie R. E. Acclimation of the respiration photosynthesis ratio to temperature: insights from a model // Global Change Biology. 1999. Vol. 5. P. 615–622.
- Drozhdov S. N., Titov A. F., Talanova V. V., Kritenko S. P., Sherudilo E. G., Akimova T. V. The effect of temperature on cold and heat resistance of growing plants. I. Chilling-sensitive species // J. Exp. Bot. 1984a. Vol. 35, no. 11. P. 1595–1602. doi: 10.1093/jxb/35.11.1595
- Drozhdov S. N., Titov A. F., Balagurova N. I., Kritenko S. P. The effect of temperature on cold and heat resistance of growing plants. II. Cold resistance species // J. Exp. Bot. 1984b. Vol. 35, no. 11. P. 1603–1608. doi: 10.1093/jxb/35.11.1603
- Dufault R. J., Melton R. R. Cyclic cold stress before transplanting influence tomato seedling growth, but not fruit earliness, fresh-market yield, or quality // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1990. Vol. 115, no. 4. P. 559–563.

- Erwin J. E., Heins R. D. Thermomorphogenic responses in stem and leaf development // Hort. Science. 1995. Vol. 30, no. 5. P. 940–949.
- Franco T. Effects of stressful and unstressful low temperature on vegetable crops: morphological and physiological aspects // Acta Hort. 1990. Vol. 287. P. 67–76. doi: 10.17660/ActaHortic.1991.287.6
- Gifford R. M. Whole plant respiration and photosynthesis of wheat under increased CO₂ concentration and temperature: Long-term vs short-term distinctions for modeling // Global Change Biology. 1995. Vol. 1. P. 385–396. doi: 10.1111/j.1365-2486.1995.tb00037.x
- Gómez I., Pérez-Rodríguez E., Viñebla B., Figue-roa F., Karsten U. Effects of solar radiation on photosynthesis, UV-absorbing compounds and enzyme activities of the green alga *Dasycladus vermicularis* from Southern Spain // J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 1998. Vol. 47. P. 46–57. doi: 10.1016/S1011-1344(98)00199-7
- Grimstad S. O. The effect of a daily low temperature pulse on growth and development of greenhouse cucumber and tomato plants during propagation // Sci. Hort. 1993. Vol. 53. P. 53–62. doi: 10.1016/0304-4238(93)90137-F
- Grimstad S. O. Low-temperature pulse affects growth and development of young cucumber and tomato plants // J. Hort. Sci. 1995. Vol. 70, no. 1. P. 75–80. doi: 10.1080/14620316.1995.11515275
- Grindal G., Moe R. Effects of temperature-drop and a short dark interruption on stem elongation and flowering in *Begonia* × *hiemalis* Fotsch. // Sci. Hort. 1994. Vol. 57. P. 123–132. doi: 10.1016/0304-4238(94)90040-X
- Grindal G., Moe R. Growth rhythm and temperature DROP // Acta Hort. 1995. Vol. 378. P. 47–52. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.378.6
- Harrison J., Nicot C., Ougham H. The effect of low temperature on patterns of cell division in developing second leaves of wild-type and slender mutant barley (*Hordeum vulgare* L.) // Plant Cell Environ. 1998. Vol. 21. P. 79–86. doi: 10.1046/j.1365-3040.1998.00250.x
- Hegarty T., Thompson R. Red beet: production and processing // Ann. Rept. Scottish Res. Inst. 1974. P. 26–27.
- Heins R. D., Erwin J. E. The history of DIF and the use of a morning temperature dip to control plant height // Minnesota Commercial Flower Grower Ass. Bull. 1991. Vol. 40, no. 6. P. 1–4.
- Hendriks L. Diffbei Beet – und Balkonpflanzen // Greenhouse Grower. 1991. Vol. 39. P. 1883–1889.
- Henriksen K. Sowing depth and N-fertilizing in relation to yield and uniformity in onion crops // Acta Hort. 1978. Vol. 72. P. 69–75. doi: 10.17660/ActaHortic.1978.72.7
- Holaday A. S., Mahan J. R., Payton P. Molecular biology and physiology: Effects of chilling temperatures on photosynthesis // J. Cotton Sci. 2016. Vol. 20. P. 220–231.
- Ihlebekk H., Eilertsen S., Junttila O., Grindal G., Moe R. Control of plant height in *Campanula isophylla* by temperature alternations; involvement of GAS // Acta Hort. 1995. Vol. 394. P. 347–355. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.394.38
- Jennerich L., Hendricks L. Temperatur regelltra-geien. Berrnhard Thalaker Verlag GmbH &Co. KG, Braunschweig. 1997. 167 p.
- Jones H. G. Plant and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology. Cambridge University Press. 2014. 423 p.
- King A. J., Reid M. S., Patterson B. D. Diurnal changes in the chilling sensitivity of seedlings // Plant Physiol. 1982. Vol. 70. P. 211–214. doi: 10.1104/pp.70.1.211
- Korkmaz A., Dufault R. J. Developmental consequences of cold temperature stress at transplanting on seedling and field growth and yield. I. Watermelon // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 2001a. Vol. 126, no. 4. P. 404–409.
- Korkmaz A., Dufault R. J. Developmental consequences of cold temperature stress at transplanting on seedling and field growth and yield. II. Muskmelon // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 2001b. Vol. 126, no. 4. P. 410–413.
- Korkmaz A., Dufault R. J. Differential cold stress duration and frequency treatment effects on muskmelon seedling and field growth and yield // Europ. J. Hort. Sci. 2004. Vol. 69, no. 1. P. 12–20.
- Koscielniak J., Biesaga-Koscielniak J. The effect of short warm breaks during chilling on water status, intensity of photosynthesis of maize seedlings and final grain yield // J. Agron. Crop Sci. 2000. Vol. 184, no. 1. P. 1–12. doi: 10.1046/j.1439-037x.2000.00365.x
- Larcher W., Kainm Ch., Wagner J. Survival types of high mountain plants under extreme temperatures // Flora. 2010. Vol. 205. P. 3–18. doi: 10.1016/j.flora.2008.12.005
- Levitt J. Responses of plants to environmental stresses: chilling, freezing and high temperature stresses. New York: Academic Press, 1980. 497 p.
- Lieberman M., Craft C. C., Audia W. V., Wilcox M. S. Biochemical studies of chilling injury in sweet potatoes // Plant Physiol. 1958. Vol. 33. P. 307–311. doi: 10.1104/pp.33.5.307
- Loveys B. R., Scheurwater I, Pons T. L., Fitter A. H., Atkin O. K. Growth temperature influences the underlying components of relative growth rate: an investigation using inherently fast- and slow-growing plant species // Plant Cell Environ. 2002. Vol. 25. P. 975–987. doi: 10.1046/j.1365-3040.2002.00879.x
- Loveys B. R., Atkinson L. J., Sherlock D. J., Roberts R. L., Fitter A. N., Atkin O. K. Thermal acclimation of leaf and root respiration: an investigation comparing inherently fast- and slow-growing plant species // Global Change Biol. 2003. Vol. 9. P. 895–910. doi: 10.1046/j.1365-2486.2003.00611.x
- Lyons J. M. Chilling injury in plants // Ann. Rev. Plant Physiol. 1973. Vol. 24. P. 445–466. doi: 10.1146/annurev.pp.24.060173.002305
- Miedema P. The effects of low temperature on *Zea mays* // Advances in Agronomy. 1982. Vol. 35. P. 93–128. doi: 10.1016/S0065-2113(08)60322-3
- Moe R. Using temperature to control plant height // Flora Culture International. 1991. Vol. 1, no. 2. P. 26–27.
- Moe R., Willumsen K., Ihlebekk I. H., Stupa A. I., Glomsrud N. M., Mortensen L. M. DIF and temperature drop responses in SDP and LDP, a comparison // Acta Hort. 1995. Vol. 378. P. 27–33. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.378.2
- Moe R. Effect of temperature and light on growth, morphogenesis, and flowering in geraniums // Proc. Third Intern. Geranium Conf. 1992. P. 265–277.

Moe R., Grindal G. Control of stem elongation: phytochrome and gibberellins involvement // J. Kor. Soc. Hort. Sci. 2000. Vol. 41. P. 662–667.

Moe R., Heins R. D. Thermo- and photomorphogenesis in plants. In Stroemme, E. (ed.) // Adv. Floricult. Res. 2000. Agric. Univ. of Norway, Aas, Norway. No. 6. P. 52–64.

Mortensen L. M., Moe R. Effects of various day and night temperature treatments on the morphogenesis and growth of some greenhouse and bedding plant species // Acta Hort. 1992. Vol. 327. P. 77–86. doi: 10.17660/ActaHortic.1992.327.9

Myster J., Moe R. Effect of diurnal temperature alternation on plant morphology in some greenhouse crops – a mini review // Sci. Hort. 1995. Vol. 62, no. 4. P. 205–215. doi: 10.1016/0304-4238(95)00783-P

Ohyama K., Omura Y., Kozai T. Effects of air temperature regimes on physiological disorders and floral development of tomato seedlings grown under continuous light // HortSci. 2005. P. 1304–1306.

Patil G. G., Alm V., Moe R., Junntila O. Interaction between phytochrome B and gibberellins in thermoperiodic responses of cucumber // J. Am. Soc. Hortic. Sci. 2003. Vol. 128. P. 642–647.

Payton P., Webb R., Kornyejev D., Allen R., Holaday A. S. Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity // J. Exp. Bot. 2001. Vol. 52. P. 2345–2354. doi: 10.1093/jexbot/52.365.2345

Perera N. H., Hartmann E., Holaday A. S. Regulation of cotton photosynthesis during moderate chilling // Plant Sci. 1995. Vol. 111. P. 133–143. doi: 10.1016/0168-9452(95)04225-J

Raison J. K., Lyons J. M. Chilling injury: a plea for uniform terminology // Plant Cell and Environ. 1986. Vol. 9, no. 6. P. 685–686. doi: 10.1111/j.1365-3040.1986.tb02098.x

Rietze E., Wiebe H.-J. Diurnal rhythm of chilling sensitivity of cucumbers in light // Sci. Hortic. 1989. Vol. 38. P. 231–237. doi: 10.1016/0304-4238(89)90070-8

Skrudlik G., Baczek-Kwinta R., Koscielniak J. The effect of short warm breaks during chilling on photosynthesis and of antioxidant enzymes in plants sensitive to chilling // J. Agron. Crop Sci. 2000. Vol. 184, no. 4. P. 233–240. doi: 10.1046/j.1439-037x.2000.00377.x

Sofalian O., Azimy S., Jahanbakhsh S., Khomari S., Dezhsetan S. Evaluating genetic diversity of chilling stress in cotton genotypes // Plant Breed. Seed Sci. 2013. Vol. 68. P. 77–87. doi: 10.2478/v10129-011-0082-2

Sonoike K. Photoinhibition and protection of photosystem I // Photosystem I: the Light-driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase, Series Advances in Photosynthesis and Respiration / Ed. J. H. Golbeck (Dordrecht: Springer). 2006. P. 657–668. doi: 10.1007/978-1-4020-4256-0_38

Stoddart J. L., Thomas H., Lloyd E. J., Pollock C. J. The use of a temperature-profiled position transducer for the study of low-temperature growth in Gramineae // Planta. 1986. Vol. 167. P. 359–363. doi: 10.1007/BF00391339

Sysoeva M. I., Markovskaya E. F., Kharkina T. G. Optimal temperature drop for the growth and development of young cucumber plants // Plant Growth Regul. 1997. Vol. 23. P. 135–139.

Sysoeva M. I., Markovskaya E. F., Kharkina T. G., Sherudilo E. G. Temperature drop, dry matter accumulation and cold resistance of young cucumber plants // Plant Growth Regul. 1999. Vol. 28. P. 89–94.

Theocharis A., Clément C., Barka E. A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures // Planta. 2012. Vol. 235, no. 6. P. 1091–1105. doi: 10.1007/s00425-012-1641-y

Tutty J. R., Hicklenton P. R., Kristie D. N., McRae K. B. The influence of photoperiod and temperature on the kinetics of stem elongation in *Dendranthema grandiflorum* // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1994. Vol. 119. P. 138–143.

Ueber E., Hendriks L. Effects of intensity, duration and timing of a temperature drop on the growth and flowering of *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. // Acta Hort. 1992. Vol. 327. P. 33–40. doi: 10.17660/ActaHortic.1992.327.4

Ueber E., Hendriks L. Intensity effects of a temperature drop on pelargoniums // Acta Hort. 1995. Vol. 378. P. 34. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.378.3

Ueber E., Hendriks L. Effect of a short duration temperature drop on water status and elongation growth of ornamental plants // Acta Hort. 1997. Vol. 435. P. 25–32. doi: 10.17660/ActaHortic.1997.435.1

Vogelezang J. V. M. Effects of timing and duration of a temperature drop in relation to sunset on shoot elongation of potplants and bedding plants // Acta Hort. 1995. Vol. 378. P. 46–46. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.378.5

Wang C. Y. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress // Hort. Sci. 1982. Vol. 17, no. 2. P. 173–186.

Wang C. Y. Approaches to reduce chilling injury of fruit and vegetables // Horticulture Review. 1993. Vol. 15. P. 63–95.

Wang C. Y., Baker Y. E. Effects of two free radical scavengers and intermittent warming on chilling injury and polar lipid composition of cucumber and sweet pepper fruits // Plant Cell Physiol. 1979. Vol. 20, no. 1. P. 243–251.

Wang H., Zhang Z., Xu L., Huang X., Pang X. The effect of delay between heat treatment and cold storage on alleviation of chilling injury in banana fruit // J. Sci. Food Agric. 2012. Vol. 92. P. 2624–2629. doi: 10.1002/jsfa.5676

Поступила в редакцию 24.06.2018

References

Akimova T. V., Drozdov S. N., Umarov H. U., Kurets V. K. Vliyanie temperatury na formirovaniye kholodoi teploustoichivost' khlopchatnika [Impact of the temperature on the formation of cold and heat tolerance

of the cotton-plant]. Dokl. AN Uzb. SSR [Proceed. AS of Uzbekistan]. 1985. No. 4. P. 53–54.

Drozdov S. N., Kurets V. K., Titov A. F. Termorezistentnost' aktivno vegetiruyushchikh rastenii [Thermore-

sistance of actively growing plants]. Leningrad: Nauka, 1984. 168 p.

Klimov S. V. Kholodovoe zakalivanie rastenii – rezul'tat podderzhaniya povyshennogo otnosheniya fotosintez/dykhaniya pri nizkikh temperaturakh [Cold hardening of plants is a result of maintenance of an increased photosynthesis/respiration ratio at low temperatures]. *Izvestiya AN. Seriya biol.* [Proceed. RAS. Ser. Biol.]. 2003. No. 1. P. 57–62.

Larcher W. *Ekologiya rastenii* [Ecology of plants]. Moscow: Mir, 1978. 185 p.

Lukatkin A. S. Kholodovoe povrezhdenie teplolyubivyykh rastenii i okislitel'nyi stress [Cold-induced damage to thermophilic plants and oxidative stress]. Saransk: Izd-vo Mordov. un-ta, 2002. 208 p.

Lukatkin A. S., Sharkaeva E. S., Aparin S. V. Rostovye reaktsii kletok konusa narastaniya teplolyubivyykh rastenii pri deistvii i posledeystvii ponizhennykh temperatur [Growth processes in apical cone cells of chilling-sensitive plants at effect and aftereffect of chilling]. *Fiziol. i biokhim. kul't. rastenii* [Physiol. and Biochem. of Cultivated Plants]. 2010. Vol. 42, no. 3. P. 256–269.

Markovskaya E. F., Sysoeva M. I., Sherudilo E. G. Kratkovremennaya gipotermiya i rastenie [Short-term hypothermia and plants]. Petrozavodsk: KarRC RAS, 2013. 194 p.

Rakhmankulova Z. F. Vzaimosvyaz' fotosinteza i dykhaniya tselogo rasteniya v norme i pri neblagopriyatnykh vneshnikh usloviyakh [Correlation between photosynthesis and respiration of an intact plant in normal and unfavorable external conditions]. *Zhurn. obshchei biol.* [Biol. Bull. Reviews]. 2002. Vol. 63, no. 3. P. 44–53.

Shibaeva T. G., Sherudilo E. G., Titov A. F. Osobennosti reaktsii rastenii *Cucumis sativus* L. na DROP v zavisimosti ot skorosti snizheniya temperatury [The effect of cooling rate on cucumber plant response to a daily short-term temperature drop]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2016. No. 7. P. 121–127. doi: 10.17076/eb489

Titov A. F., Drozdov S. N., Akimova T. V., Talanova V. V. Issledovanie reaktsii rastenii soi na deistvie temperatury. Granitsy temperaturnykh zon [Study of soybean plants reaction to temperature. Limits of temperature zones]. *Fiziol. rastenii* [Plant Physiol.]. 1987. Vol. 34, no. 2. P. 350–355.

Titov A. F., Akimova T. V., Balagurova N. I., Talanova V. V., Topchieva L. V., Sherudilo E. G. Ustoichivost' aktivno vegetiruyuschikh rastenii k nizkim i vysokim temperaturam. I. Zakonomernosti var'irovaniya us-toichivosti [Tolerance of actively growing plants to low and high temperatures. I. Tolerance variation patterns]. *Nazemnye i vodnye ekosistemy Severnoi Evropy: upravlenie i okhrana: Mater. mezhd. konf., posvyashch. 50-letiyu IB KarRC RAN* [Terrestrial and aquatic ecosystems of Northern Europe: management and protection. Proceed. Int. Conf. dedicated to the 50th Anniv. of Inst. of Biol. KarRC RAS]. Petrozavodsk, 2003. P. 138–144.

Aghdam M. S., Bodbodak S. Postharvest heat treatment for mitigation of chilling injury in fruits and vegetables. *Food Bioprocess Technol.* 2014. Vol. 7. P. 37–53. doi: 10.1007/s11947-013-1207-4

Alscher G., Rietze E., Wiebe H.-J. Diurnal chilling sensitivity of some vegetable crops. *Biotronics.* 1988. Vol. 17. P. 17–20.

Atkin O. K., Bruhn D., Hurry V. M., Tjoelker M. G. The hot and the cold: unraveling the variable response of plant respiration to temperature. *Funct. Plant Biol.* 2005. Vol. 32. P. 87–105. doi: 10.1071/FP03176

Atkin O. K., Scheurwater I., Pons T. L. High thermal acclimation potential of both photosynthesis and respiration in two lowland *Plantago* species in contrast to an alpine congeneric. *Global Change Biology.* 2006. Vol. 12. P. 500–515. doi: 10.1111/j.1365-2486.2006.01114

Bange M. P., Milroy S. P. Growth and dry matter partitioning of diverse cotton genotypes. *Field Crops Res.* 2004. Vol. 87, no. 1. P. 73–87. doi: 10.1016/j.fcr.2003.09.007

Bradov J. M. Cotton cultivar responses to sub-optimal postemergent temperatures. *Crop Sci.* 1991. Vol. 31. P. 1595–1599. doi: 10.2135/cropsci1991.0011183X003100060043x

Campbell C., Atkinson L., Zaragoza-Castells J., Lundmark M., Atkin O., Hurry V. Acclimation of photosynthesis and respiration is asynchronous in response to changes in temperature regardless of plant functional group. *New Phytol.* 2007. Vol. 176, no. 2. P. 375–389. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02183.x

Creencia R. P., Bramlage W. J. Reversibility of chilling injury to corn seedlings. *Plant Physiol.* 1971. Vol. 47. P. 389–392. doi: 10.1104/pp.47.3.389

Currah I. Plant uniformity at harvest related to variation between emerging seedlings. *Acta Hort.* 1978. Vol. 72. P. 57–68. doi: 10.17660/ActaHortic.1978.72.6

Dewar R. C., Medlyn B. E., McMurtrie R. E. Acclimation of the respiration/photosynthesis ratio to temperature: insights from a model. *Global Change Biology.* 1999. Vol. 5. P. 615–622.

Drozdov S. N., Titov A. F., Talanova V. V., Kritenko S. P., Sherudilo E. G., Akimova T. V. The effect of temperature on cold and heat resistance of growing plants. I. Chilling-sensitive species. *J. Exp. Bot.* 1984a. Vol. 35, no. 11. P. 1595–1602. doi: 10.1093/jxb/35.11.1595

Drozdov S. N., Titov A. F., Balagurova N. I., Kritenko S. P. The effect of temperature on cold and heat resistance of growing plants. II. Cold resistance species. *J. Exp. Bot.* 1984b. Vol. 35, no. 11. P. 1603–1608. doi: 10.1093/jxb/35.11.1603

Dufault R. J., Melton R. R. Cyclic cold stress before transplanting influence tomato seedling growth, but not fruit earliness, fresh-market yield, or quality. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1990. Vol. 115, no. 4. P. 559–563.

Erwin J. E., Heins R. D. Thermomorphogenic responses in stem and leaf development. *Hort. Science.* 1995. Vol. 30, no. 5. P. 940–949.

Franco T. Effects of stressful and unstressful low temperature on vegetable crops: morphological and physiological aspect. *Acta Hort.* 1990. Vol. 287. P. 67–76. doi: 10.17660/ActaHortic.1991.287.6

Gifford R. M. Whole plant respiration and photosynthesis of wheat under increased CO₂ concentration and temperature: Long-term vs short-term distinctions for modeling. *Global Change Biology.* 1995. Vol. 1. P. 385–396. doi: 10.1111/j.1365-2486.1995.tb00037.x

Gómez I., Pérez-Rodríguez E., Viñegla B., Figueroa F., Karsten U. Effects of solar radiation on photosynthesis, UV-absorbing compounds and enzyme ac-

- tivities of the green alga *Dasycladus vermicularis* from Southern Spain. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 1998. Vol. 47. P. 46–57. doi: 10.1016/S1011-1344(98)00199-7
- Grimstad S. O. The effect of a daily low temperature pulse on growth and development of greenhouse cucumber and tomato plants during propagation. *Sci. Hort.* 1993. Vol. 53. P. 53–62. doi: 10.1016/0304-4238(93)90137-F
- Grimstad S. O. Low-temperature pulse affects growth and development of young cucumber and tomato plants. *J. Hort. Sci.* 1995. Vol. 70, no. 1. P. 75–80. doi: 10.1080/14620316.1995.11515275
- Grindal G., Moe R. Effects of temperature-drop and a short dark interruption on stem elongation and flowering in *Begonia* × *hiemalis* Fotsch. *Sci. Hort.* 1994. Vol. 57. P. 123–132. doi: 10.1016/0304-4238(94)90040-X
- Grindal G., Moe R. Growth rhythm and temperature DROP. *Acta Hort.* 1995. Vol. 378. P. 47–52. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.378.6
- Harrison J., Nicot C., Ougham H. The effect of low temperature on patterns of cell division in developing second leaves of wild-type and slender mutant barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Environ.* 1998. Vol. 21. P. 79–86. doi: 10.1046/j.1365-3040.1998.00250.x
- Hegarty T., Thompson R. Red beet: production and processing. *Ann. Rept. Scottish Res. Inst.* 1974. P. 26–27.
- Heins R. D., Erwin J. E. The history of DIF and the use of a morning temperature dip to control plant height. *Minnesota Commercial Flower Grower Ass. Bull.* 1991. Vol. 40, no. 6. P. 1–4.
- Hendriks L. Diffbei Beet – und Balkonpflanzen. *Greenhouse Grower.* 1991. Vol. 39. P. 1883–1889.
- Henriksen K. Sowing depth and N-fertilizing in relation to yield and uniformity in onion crops. *Acta Hort.* 1978. Vol. 72. P. 69–75. doi: 10.17660/ActaHortic.1978.72.7
- Holiday A. S., Mahan J. R., Payton P. Molecular biology and physiology: Effects of chilling temperatures on photosynthesis. *J. Cotton Sci.* 2016. Vol. 20. P. 220–231.
- Ihlebekk H., Eilertsen S., Junttila O., Grindal G., Moe R. Control of plant height in *Campanula isophylla* by temperature alternations; involvement of GAS. *Acta Hort.* 1995. Vol. 394. P. 347–355. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.394.38
- Ikkonen E. N., Shibaeva T. G., Titov A. F. Influence of daily short-term temperature drops on respiration to photosynthesis ratio in chilling-sensitive plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 2018. Vol. 65, no. 1. P. 78–83. doi: 10.1134/S1021443718010041
- Jennerich L., Hendricks L. Temperatur regellstrategien. Berrnhard Thalaker Verlag GmbH and Co. KG, Braunschweig. 1997. 167 p.
- Jones H. G. Plant and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology. Cambridge University Press. 2014. 423 p.
- King A. J., Reid M. S., Patterson B. D. Diurnal changes in the chilling sensitivity of seedlings. *Plant Physiol.* 1982. Vol. 70. P. 211–214. doi: 10.1104/pp.70.1.211
- Korkmaz A., Dufault R. J. Developmental consequences of cold temperature stress at transplanting on seedling and field growth and yield. I. Watermelon. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2001a. Vol. 126, no. 4. P. 404–409.
- Korkmaz A., Dufault R. J. Developmental consequences of cold temperature stress at transplanting on seedling and field growth and yield. II. Muskmelon. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2001b. Vol. 126, no. 4. P. 410–413.
- Korkmaz A., Dufault R. J. Differential cold stress duration and frequency treatment effects on muskmelon seedling and field growth and yield. *Europ. J. Hort. Sci.* 2004. Vol. 69, no. 1. P. 12–20.
- Koscielniak J., Biesaga-Koscielniak J. The effect of short warm breaks during chilling on water status, intensity of photosynthesis of maize seedlings and final grain yield. *J. Agron. Crop Sci.* 2000. Vol. 184, no. 1. P. 1–12. doi: 10.1046/j.1439-037x.2000.00365.x
- Larcher W., Kainm Ch., Wagner J. Survival types of high mountain plants under extreme temperatures. *Flora.* 2010. Vol. 205. P. 3–18. doi: 10.1016/j.flora.2008.12.005
- Levitt J. Responses of plants to environmental stresses: chilling, freezing and high temperature stresses. New York: Academic Press, 1980. 497 p.
- Lieberman M., Craft C. C., Audia W. V., Wilcox M. S. Biochemical studies of chilling injury in sweet potatoes. *Plant Physiol.* 1958. Vol. 33. P. 307–311. doi: 10.1104/pp.33.5.307
- Loveys B. R., Scheurwater I., Pons T. L., Fitter A. H., Atkin O. K. Growth temperature influences the underlying components of relative growth rate: an investigation using inherently fast- and slow-growing plant species. *Plant, Cell and Environ.* 2002. Vol. 25. P. 975–987. doi: 10.1046/j.1365-3040.2002.00879.x
- Loveys B. R., Atkinson L. J., Sherlock D. J., Roberts R. L., Fitter A. N., Atkin O. K. Thermal acclimation of leaf and root respiration: an investigation comparing inherently fast- and slow-growing plant species. *Global Change Biol.* 2003. Vol. 9. P. 895–910. doi: 10.1046/j.1365-2486.2003.00611.x
- Lyons J. M. Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1973. Vol. 24. P. 445–466. doi: 10.1146/annurev.pp.24.060173.002305
- Miedema P. The effects of low temperature on *Zea mays*. *Advances in Agronomy.* 1982. Vol. 35. P. 93–128. doi: 10.1016/S0065-2113(08)60322-3
- Moe R. Using temperature to control plant height. *Flora Culture International.* 1991. Vol. 1, no. 2. P. 26–27.
- Moe R., Willumsen K., Ihlebekk I. H., Stupa A. I., Glomsrud N. M., Mortensen L. M. DIF and temperature drop responses in SDP and LDP, a comparison. *Acta Hort.* 1995. Vol. 378. P. 27–33. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.378.2
- Moe R. Effect of temperature and light on growth, morphogenesis, and flowering in geraniums. *Proc. Third Intern. Geranium Conf.* 1992. P. 265–277.
- Moe R., Grindal G. Control of stem elongation: phytochrome and gibberellins involvement. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 2000. Vol. 41. P. 662–667.
- Moe R., Heins R. D. Thermo- and photomorphogenesis in plants. *Adv. Floricult. Res. Report.* No. 6. 2000. Agric. Univ. of Norway, Aas, Norway. P. 52–64.

- Mortensen L. M., Moe R. Effects of various day and night temperature treatments on the morphogenesis and growth of some greenhouse and bedding plant species. *Acta Hort.* 1992. Vol. 327. P. 77–86. doi: 10.17660/ActaHortic.1992.327.9
- Myster J., Moe R. Effect of diurnal temperature alternation on plant morphology in some greenhouse crops – a mini review. *Sci. Hort.* 1995. Vol. 62, no. 4. P. 205–215. doi: 10.1016/0304-4238(95)00783-P
- Ohyama K., Omura Y., Kozai T. Effects of air temperature regimes on physiological disorders and floral development of tomato seedlings grown under continuous light. *HortSci.* 2005. P. 1304–1306.
- Patil G. G., Alm V., Moe R., Junttila O. Interaction between phytochrome B and gibberellins in thermoperiodic responses of cucumber. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2003. Vol. 128. P. 642–647.
- Payton P., Webb R., Korniyev D., Allen R., Holaday A. S. Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. *J. Exp. Bot.* 2001. Vol. 52. P. 2345–2354. doi: 10.1093/jexbot/52.365.2345
- Perera N. H., Hartmann E., Holaday A. S. Regulation of cotton photosynthesis during moderate chilling. *Plant Sci.* 1995. Vol. 111. P. 133–143. doi: 10.1016/0168-9452(95)04225-J
- Raison J. K., Lyons J. M. Chilling injury: a plea for uniform terminology. *Plant, Cell and Environ.* 1986. Vol. 9, no. 6. P. 685–686. doi: 10.1111/j.1365-3040.1986.tb02098.x
- Rietze E., Wiebe H.-J. Diurnal rhythm of chilling sensitivity of cucumbers in light. *Sci. Hort.* 1989. Vol. 38. P. 231–237. doi: 10.1016/0304-4238(89)90070-8
- Shibaeva T. G., Sherudilo E. G., Titov A. F. Response of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants to prolonged permanent and short-term daily exposures to chilling temperature. *Russ. J. Plant Physiol.* 2018. Vol. 65, no. 2. P. 286–294. doi: 10.1134/S1021443718020061
- Skrudlik G., Baczek-Kwinta R., Koscielniak J. The effect of short warm breaks during chilling on photosynthesis and of antioxidant enzymes in plants sensitive to chilling. *J. Agron. Crop Sci.* 2000. Vol. 184, no. 4. P. 233–240. doi: 10.1046/j.1439-037x.2000.00377.x
- Sofalian O., Azimy S., Jahanbakhsh S., Khomari S., Dezhsetan S. Evaluating genetic diversity of chilling stress in cotton genotypes. *Plant Breed. Seed Sci.* 2013. Vol. 68. P. 77–87. doi: 10.2478/v10129-011-0082-2
- Sonoike K. Photoinhibition and protection of photosystem I. *Photosystem I: the Light-driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase, Series Advances in Photosynthesis and Respiration.* Dordrecht: Springer, 2006. P. 657–668. doi: 10.1007/978-1-4020-4256-0_38
- Stoddart J. L., Thomas H., Lloyd E. J., Pollock C. J. The use of a temperature-profiled position transducer for the study of low-temperature growth in Gramineae. *Planta.* 1986. Vol. 167. P. 359–363. doi: 10.1007/BF00391339
- Sysoeva M. I., Markovskaya E. F., Kharkina T. G. Optimal temperature drop for the growth and development of young cucumber plants. *Plant Growth Regul.* 1997. Vol. 23. P. 135–139.
- Sysoeva M. I., Markovskaya E. F., Kharkina T. G., Sherudilo E. G. Temperature drop, dry matter accumulation and cold resistance of young cucumber plants. *Plant Growth Regul.* 1999. Vol. 28. P. 89–94.
- Theocharis A., Clément C., Barka E. A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta.* 2012. Vol. 235, no. 6. P. 1091–1105. doi: 10.1007/s00425-012-1641-y
- Tutty J. R., Hicklenton P. R., Kristie D. N., McRae K. B. The influence of photoperiod and temperature on the kinetics of stem elongation in *Dendranthema grandiflorum*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1994. Vol. 119. P. 138–143.
- Ueber E., Hendriks L. Effects of intensity, duration and timing of a temperature drop on the growth and flowering of *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. *Acta Hort.* 1992. Vol. 327. P. 33–40. doi: 10.17660/ActaHortic.1992.327.4
- Ueber E., Hendriks L. Intensity effects of a temperature drop on pelargoniums. *Acta Hort.* 1995. Vol. 378. P. 34. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.378.3
- Ueber E., Hendriks L. Effect of a short duration temperature drop on water status and elongation growth of ornamental plants. *Acta Hort.* 1997. Vol. 435. P. 25–32. doi: 10.17660/ActaHortic.1997.435.1
- Vogelezang J. V. M. Effects of timing and duration of a temperature drop in relation to sunset on shoot elongation of potplants and bedding plants. *Acta Hort.* 1995. Vol. 378. P. 46–46. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.378.5
- Wang C. Y. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. *Hort. Sci.* 1982. Vol. 17, no. 2. P. 173–186.
- Wang C. Y. Approaches to reduce chilling injury of fruit and vegetables. *Horticulture Review.* 1993. Vol. 15. P. 63–95.
- Wang C. Y., Baker Y. E. Effects of two free radical scavengers and intermittent warming on chilling injury and polar lipid composition of cucumber and sweet pepper fruits. *Plant Cell Physiol.* 1979. Vol. 20, no. 1. P. 243–251.
- Wang H., Zhang Z., Xu L., Huang X., Pang X. The effect of delay between heat treatment and cold storage on alleviation of chilling injury in banana fruit. *J. Sci. Food Agric.* 2012. Vol. 92. P. 2624–2629. doi: 10.1002/jsfa.5676

Received June 24, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шибаета Татьяна Геннадиевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: shibaeva@krc.karelia.ru

Икконен Елена Николаевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: likkonen@gmail.com

Шерудило Елена Георгиевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: sherudil@krc.karelia.ru

Титов Александр Федорович

руководитель лаб. экологической физиологии растений,
главный научный сотрудник отдела комплексных научных
исследований КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru

CONTRIBUTORS:

Shibaeva, Tatyana

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

Ikkonen, Elena

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

Sherudilo, Elena

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

Titov, Alexander

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.3

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С НАНОЧАСТИЦАМИ УГЛЕРОДА ШУНГИТА: ДАННЫЕ ЭПР СПИН-ЗОНДА

С. П. Рожков, А. С. Горюнов

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

Методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спин-зонда (СЗ) исследованы конформационные эффекты взаимодействия молекул сывороточного альбумина (СА) быка и человека с наночастицами углерода шунгита (ШУ) в водной дисперсии в диапазоне температур 17–72 °С. Получены температурные и кинетические зависимости параметров спектра ЭПР для растворов и дисперсий СА и ШУ, а также их смесей. Показано, что взаимодействие молекул СА с наночастицами ШУ оказывает существенное влияние на термоиндуцированные конформационные изменения белка, которые определяют способность SH группы Цис-34 СА переводить в диамагнитное состояние NO-группу доксилстеариновой жирной кислоты (ЖК), использованной в качестве СЗ. В присутствии ШУ температурные переходы, отражающие конформационные изменения СА в области локализации СЗ, становятся менее выраженными и сдвигаются в сторону более высоких температур. Это может быть связано с изменением окислительно-восстановительного баланса совокупности молекул СА в растворе или дисперсии, поскольку ШУ выступает как окислитель по отношению к СА. Поэтому ШУ также может рассматриваться как агент, способный влиять на степень окисления Цис-34 СА такими свободными радикалами, как СЗ. Наночастицы ШУ и СЗ конкурируют между собой в процессе окисления Цис-34. Кроме того, при рассматриваемых конформационных переходах облегчается перенос СЗ с СА на наночастицы, что препятствует восстановлению NO-группы СЗ SH-группами белка. Это дает основание рассматривать наночастицы ШУ как фактор регуляции окислительно-восстановительного баланса в системах с участием СА, включая физиологические среды.

Ключевые слова: водная нанодисперсия углерода; глобулярный белок; спин-меченая жирная кислота; предденатурационный диапазон температур.

**S. P. Rozhkov, A. S. Goryunov. CONFORMATIONAL EFFECTS OF
SERUM ALBUMINE INTERACTION WITH NANOPARTICLES OF CARBON
SHUNGITE: EPR SPIN PROBING DATA**

Conformational effects of interaction between bovine and human serum albumin (SA) molecules and nanoparticles of shungite carbon (ShC) in aqueous dispersion were stud-

ied in the temperature range 17–72 °C K using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of spin probes (SP). The temperature and kinetic dependences of EPR spectrum parameters for SA and ShC solutions and dispersions, as well as for their mixtures were obtained. The interaction of SA molecules with ShC nanoparticles has been shown to significantly affect the thermally induced protein conformational changes, which determine the ability of the Cys-34 SH group in SA to convert the NO group of the doxyl stearic fatty acid (FA) used as the probe to diamagnetic state. The temperature transitions reflecting the SA conformational changes in the region of SP localization become less pronounced and shift toward higher temperatures in the presence of ShC. This may be due to a change in the redox balance of the SA molecules pool in the solution or dispersion, since ShC acts as an oxidant to SA. Therefore, ShC can also be considered an agent capable of affecting the degree of oxidation of Cys-34 of SA by free radicals, such as SP. ShC nanoparticles and SP compete with each other during the oxidation of Cys-34. Furthermore, the transfer of SP from SA to nanoparticles is facilitated due to the conformational transitions, whereby the reduction of the probe NO group by the protein SH groups is impeded. ShC nanoparticles can therefore be regarded as a factor regulating the redox balance in systems involving SA, including physiological media.

Key words: aqueous carbon nanodispersion; globular protein; spin-labeled fatty acid; pre-denaturation temperature range.

Введение

Исследование эффектов и механизмов взаимодействия наночастиц с биомолекулами необходимо для разрешения как экологических вопросов, связанных с токсическим влиянием на живые организмы, так и биомедицинских задач регуляции связывания и транспорта лигандов белками, а также окислительно-восстановительного баланса в системах с участием белков. В последнее время все большее внимание уделяется графенам и оксидам графена как наиболее перспективным наноматериалам для биомедицинских целей благодаря их уникальным свойствам – двумерной структуре, большой поверхности, химической и механической стабильности, специфическим электронным свойствам и биосовместимости [Liu et al., 2013]. Это обеспечивает им потенциальную возможность осуществлять транспортную функцию по доставке белков, лекарственных препаратов, а также выступать в качестве биосенсоров, искусственных ферментов-пероксидаз [Ni et al., 2013; Sun et al., 2015]. Наряду с тем интересом, который графеновые структуры вызывают с точки зрения их физической, химической, кристаллической и фазовой природы, большое внимание в настоящее время сосредоточено на изучении биологических взаимодействий этих двумерных наноматериалов для новых разработок в области биомедицины и обеспечения охраны здоровья и безопасности человека в разных областях их применения [Wang et al., 2016].

Сывороточный альбумин (СА) является одним из наиболее распространенных модельных объектов при изучении молекулярных биологи-

ческих взаимодействий углеродных наночастиц, что определяется его доступностью и важнейшей физиологической ролью в функционировании различных тканей и сред организма животных и человека [Peters, 1996]. Наряду с поддержанием коллоидно-осмотического гомеостаза тканей, связыванием и транспортом физиологически значимых молекул и ионов СА имеет важную антиоксидантную функцию, обусловленную способностью тиоловой группы аминокислоты цистеина (Цис) взаимодействовать со свободными радикалами и активными формами кислорода [Turell, 2013]. Сывороточные альбумины человека (САЧ) и быка (САБ) содержат по 35 цистеинов, которые формируют 17 дисульфидных мостиков, оставляя свободным Цис-34. Он локализован в гидрофобной полости глубиной около 1 нм домена I [Stewart et al., 2005]. Связывание одной и двух жирных кислот (ЖК) существенно сказывается как на раскрытии полости Цис-34, так и на глобальном разворачивании структуры альбумина, что повышает подвижность атомных групп, формирующих полость Цис-34.

Структурно-динамическое состояние молекул альбумина характеризуется рядом обратимых конформационных переходов в области нефизиологических значений pH. Повышение температуры до 55 °C также вызывает постепенное и обратимое изменение конформации белка на уровне вторичной структуры. Наиболее значимые изменения, обусловленные плавлением одного из доменов белка, проявляются около 42–43 °C [Rezaei-Tavirani et al., 2006; Iosin et al., 2011]. Для области 58–65 °C характерно резкое начало денатурационных процессов [Borzova et al., 2016]. Связывание ЖК в физио-

логических условиях также вызывает локальные и глобальные изменения, проявляющиеся как на уровне относительного взаимного смещения трех доменов структуры СА, так и в изменениях меньшего масштаба в области SH-группы аминокислотного остатка Цис-34 [Turell et al., 2013]. Считается, что тиоловая группа Цис-34 способна находиться в двух микросостояниях: восстановленная форма – преимущественно в закрытой полости и окисленная – при раскрытии полости. Близлежащие аминокислотные остатки Гис-39 и Тир-84 также влияют на реактивность тиоловой группы [Turell et al., 2013]. Взаимодействие с ЖК, не находящимися в непосредственном контакте с Цис-34, также индуцирует конформационные изменения в его окружении, способствующие образованию дисульфида [Gryzunov et al., 2003]. Окисление альбумина и по другим аминокислотным остаткам влияет в некоторой степени на термостабильность белка, устойчивость к агрегации и морфологию агрегатов [Sancataldo et al., 2014].

По данным последних лет, различные наночастицы также оказывают заметное влияние как на окислительные свойства альбумина, так и на его конформацию. Показано, что альбумин адсорбируется на наночастицах практически любой природы, часто формируя белковую корону [Tsai et al., 2011; Chen, Wu, 2012; Roy, Das, 2014; Rajeshvari et al., 2014; Esfandfar et al., 2016]. При этом конформация белка может изменяться, что определяется свойствами поверхности наночастиц и окружающего растворителя [Chakraborty et al., 2011; Huang et al., 2014]. Наночастицы могут как провоцировать, так и ингибировать агрегацию белка [Zaman et al., 2014]. Конформационные переходы могут значительно смещаться по температурной шкале [Iosin et al., 2011]. Подобные эффекты могут способствовать патологическим процессам, связанным с конформационными заболеваниями [Zaman et al., 2014]. Они имеют самостоятельное значение для решения задач биомедицины и протеомики [Couto et al., 2017] либо используются для регуляции образования агрегатов при тепловой обработке белка в клинических целях или для создания биосовместимых покрытий. При этом потенциал применения наночастиц особенно возрастает, если целенаправленно модифицировать их поверхность биополимерами [Liu et al., 2010; Kavitha et al., 2014; Treuel et al., 2014].

В наших работах недавно было показано [Горюнов и др., 2016; Рожков, Горюнов, 2017], что наночастицы углерода, получаемые из природного сырья – шунгитов с использованием

методов зеленой химии [Rozhkova et al., 2016], также адсорбируют молекулы альбумина с образованием белковой короны и конкурируют с молекулами белка в их способности связывать и транспортировать жирные кислоты. Основным структурным элементом шунгитового углерода (ШУ) являются непланарные молекулы, которые, как показывают данные целого ряда экспериментальных методов [Шека, Рожкова, 2016], близки по свойствам к восстановленному оксиду графена (ВОГ) [Stankovich et al., 2007; Kim et al., 2011]. Наночастицы ШУ также образуют устойчивые водные дисперсии с концентрацией углерода до 0,1 мг/мл без дополнительной стабилизации ПАВ даже в физиологических средах и в условиях кипения воды [Rozhkova et al., 2016].

Гидрофобный спиновый зонд на основе стеариновой ЖК, образующий устойчивый конъюгат с сывороточным альбумином, успешно используется для регистрации локальных и глобальных конформационных изменений белка в различных условиях [Pavićević et al., 2014, 2017]. Так, при использовании спин-зонда в молярном отношении 1:1 были зафиксированы локальные термоиндуцированные конформационные изменения в диапазонах 15–23 и 38–45 °С в зависимости от деривата ЖК [Morrisett et al., 1974]. Также было обнаружено, что глобальное разворачивание структуры альбумина, вызванное связыванием ЖК, увеличивает гибкость микроокружения Цис-34 [Pavićević et al., 2017], что сопряжено с его способностью к окислению [Wetzel et al., 1980]. Связанные ЖК осуществляют перманентную миграцию между центрами связывания и доменами белка [Gurachevsky et al., 2007; Muravsky et al., 2009; Junk et al., 2011].

Таким образом, исследование структурно-динамического состояния СА методом спин-зонда на основе ЖК призвано ответить на вопрос о наличии конформационных эффектов взаимодействия СА с углеродными наночастицами из природного шунгитового горнорудного сырья, а также о возможных механизмах такого взаимодействия, значимых с биомедицинской и природоохранной точек зрения. С термоиндуцируемыми конформационными изменениями в СА, затрагивающими микроокружение свободной SH-группы цистеина, непосредственным образом связаны окислительно-восстановительные свойства альбумина. При этом связывание с ЖК оказывает существенное влияние как на конформацию белка, так и на окисление сульфгидрильных групп [Takabayashi et al., 1983], при котором нитроксильный радикал спин-зонда восста-

навливается (с потерей парамагнетизма) под влиянием взаимодействия с SH-группой белка [Wetzel et al., 1980], зависящим от конформационного состояния микроокружения SH-группы, ее доступности зонду и растворителю. Поэтому изучение термоиндуцированных конформационных изменений в системе «жирнокислотный спин-зонд – СА – наночастицы ШУ» позволяет ответить на поставленный вопрос.

Материалы и методы

Изучение конформационных переходов в молекуле СА и влияния на них взаимодействия СА с наночастицами углерода шунгита в водной дисперсии проводилось с применением гидрофобного спинового зонда на основе доксил-стеариновой ЖК (ДСК), который сорбировался молекулами СА. Использовались зонд 5-DOXIL-stearic acid (5DSA) (Sigma) и сывороточные альбумины быка (САБ, PAA Laboratories GmbH) и человека (САЧ, 5-я фракция, Sigma), а также дисперсии ШУ с концентрацией углерода 0,1 мг/мл, приготовленные согласно разработанной методике [Рожкова, 2011]. Радиус наночастиц ШУ в водной дисперсии, определенный по максимуму кривой распределения интенсивности динамического рассеяния света по размерам, составлял 51 нм, дзета-потенциал наночастиц – около –30 мВ. Измерения проводились с помощью анализатора Nanosizer NanoZS, Malvern.

Спектры ЭПР спин-зонда регистрировались на радиоспектрометре ЭПР Bruker EMX 6/1 с термостатируемой ячейкой резонатора ($\pm 0,2$ °C) при амплитуде модуляции 1Гс и СВЧ мощности 12,6 мВт, при которых не наблюдалось насыщения сигнала. Изменение температуры осуществлялось со скоростью 0,2 градуса в минуту.

Спин-зонд, изначально растворенный в хлороформе, осаждался, образуя в ходе испарения растворителя пленку, на которую затем наносились растворы альбумина и дисперсии наночастиц ШУ. При этом часть зонда из пленки связывалась с молекулами белка или наночастицами. Различные молярные соотношения зонд/белок были получены путем варьирования времени инкубации. При молярном отношении зонд/белок 1 : 1, pH водного раствора 7,4 и концентрации белка 33 мг/мл альбумин претерпевает конформационные изменения в диапазонах температур 15–23 и 38–45 °C [Morrisett et al., 1974].

Относительная интегральная интенсивность, полученная двойным интегрированием

спектров, составляла $0,4 \cdot 10^9$ отн. ед. при соотношении зонд/белок 1 : 1. Спектр ЭПР спин-зонда, связанного молекулами САБ, характеризовался наличием сильно уширенных А-компонент, которые обусловлены иммобилизацией зонда, находящегося в гидрофобных полостях белка. На фоне А-компонент наблюдались узкие В-компоненты от спин-зондов, осуществляющих диффузию в поверхностных областях белка на границе с водным растворителем (рис. 1). Доля таких зондов обычно не превышает 3 % для белка, не подвергавшегося денатурации. При необратимой денатурации и агрегации белка в результате отжига при 72 °C и охлаждения до 18 °C вклад В-компонент спектра ЭПР зонда 5DSA заметно увеличивается. Зонды на основе ДСК достаточно жестко связаны с белком за счет адсорбции в неполярной полости белка, в связи с чем такой параметр спектра, как величина тензора сверхтонкой структуры (СТС) $2A_{zz}$, может быть

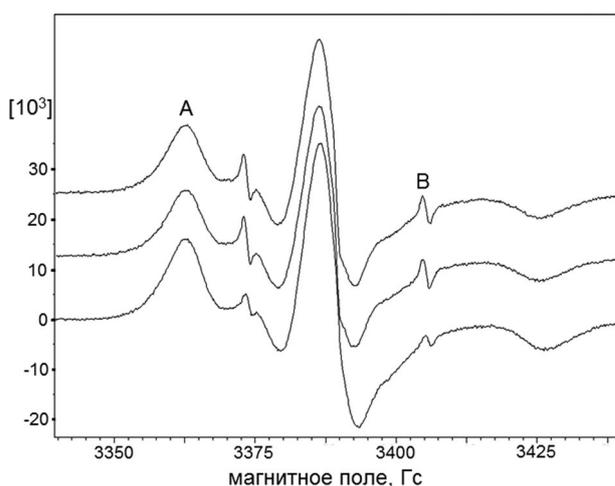


Рис. 1. Спектры ЭПР спин-зонда на основе доксил-стеариновой кислоты, связанной с молекулами бычьего сывороточного альбумина (БСА). Нижний спектр – БСА (17 мг/мл) при 17 °C. Этот спектр аналогичен спектру в присутствии 0,01 мг/мл наночастиц наноглерода шунгита (ШУ) в дисперсии. Средний спектр – БСА после прогрева при 72 °C в течение 3 мин и охлажденный до 18 °C. Верхний спектр – БСА после прогрева при 72 °C в течение 3 мин в присутствии наночастиц ШУ и охлажденный до 18 °C. Отношение зонд/белок равно 2

Fig. 1. EPR spectra of doxylstearic acid spin-probe associated with bovine serum albumin (BSA) molecules. Lower spectrum is for BSA, 17 mg/ml at 17 °C. The spectrum is analogous to the spectrum in presence of 0.01 mg/ml shungite nanocarbon (ShC) in the dispersion. Middle spectrum is for BSA after heating to 72 °C for 3 minutes and cooling to 18 °C. Upper spectrum is for BSA after heating to 72 °C for 3 minutes in presence of ShC nanoparticles and cooling to 18 °C. Ratio spin-probe/protein equals 2

даже использован для оценки времени корреляции вращательной диффузии молекулы белка и оценки индекса гидрофобности окружения нитроксильной группы зонда [Кузнецов, 1976]. При этом ЖК способны обмениваться центрами сорбции на белке [Gurachevsky et al., 2007], что также может вносить вклад в возникновение В-компоненты спектра.

При соотношении зонд/белок более 2 : 1 (интегральная интенсивность $> 0,9 \cdot 10^9$ отн. ед.) и концентрации белка более 50 мг/мл узких компонент в спектре не наблюдалось. Это обусловлено уширением, связанным с вкладом обменных взаимодействий зондов [Gurachevsky et al., 2007; Junk et al., 2011]. При этом основные параметры спектра ЭПР (величина $2A_{zz}$, определяемая как расстояние между крайними компонентами спектра в единицах напряженности поля, а также амплитуда и ширина центральной компоненты) монотонно изменялись с температурой и практически не зависели от присутствия или отсутствия ШУ. Поэтому для регистрации эффектов взаимодействия белка с наночастицами и сопряженных конформационных изменений белка подбирали наименьшую величину отношения зонд/белок/наночастица, обеспечивающую, с одной стороны, приемлемое отношение сигнал/шум в спектрах ЭПР, а с другой – минимальное влияние на конформационное состояние молекул альбумина [Pavićević et al., 2017].

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлена температурная зависимость изменения нормированных амплитуд А и В компонент спектра ЭПР спин-зонда, связанного с молекулами БСА, а также интегральной интенсивности этого спектра. Температурное поведение амплитуд А и В компонент отражает в первую очередь обычный термоактивационный процесс увеличения подвижности зонда. Вместе с тем поведение интенсивности А и В компонент не описывается законом Аррениуса (экспонентой). Кроме того, при температурах выше 320 К (47 °С) зависимость амплитуды А-компоненты вместе с интегральной интенсивностью спектра заметно отклоняется от линейности в сторону уменьшения, тогда как зависимость В-компоненты – в сторону увеличения. Это обусловлено тем, что В-компонента вносит незначительный вклад в интегральную

интенсивность и указывает на перераспределение А и В состояний в области 320 К (47 °С). Такое перераспределение вероятно связано с конформационным переходом в молекуле альбумина в данном температурном интервале, обычно наблюдаемом после 42 °С [Josin et al., 2011].

На рис. 3 показана температурная зависимость изменения нормированных интегральных интенсивностей спектров ЭПР спин-зонда 5DSA для трех разных систем: зонд на альбумине в водном растворе, зонд на альбумине в присутствии наночастиц ШУ и зонд на наночастицах ШУ. Обычно интенсивность центральной линии спектров ЭПР зондов (или меток)

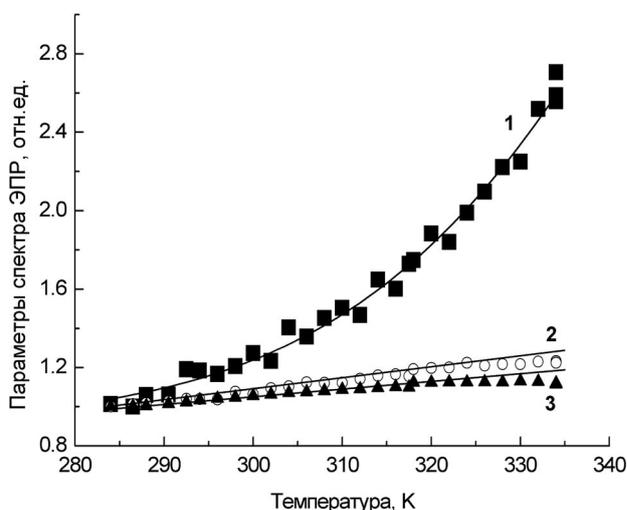


Рис. 2. Температурные зависимости параметров ЭПР спектра спин-зонда на основе доксилстеариновой кислоты, связанной с молекулами бычьего сывороточного альбумина (БСА): амплитуда В-компоненты спектра (1); амплитуда А-компоненты (2); интегральная интенсивность спектра (3). Концентрация белка – 20 мг/мл в дистиллированной воде. Кривая (1) аппроксимирована сигмоидой, начальные участки кривых (2) и (3) аппроксимированы прямыми, чтобы показать отклонение зависимостей от линейности при температурах выше 320 К (47 °С). На этом и последующих рисунках представлены значения спектральных характеристик, нормированные на исходные значения при минимальной температуре

Fig. 2. Temperature dependences of the EPR spectrum parameters of the doxylstearic acid spin probe associated with bovine serum albumin (BSA) molecules: amplitude of spectrum В-component (1); amplitude of spectrum А-component (2); integral intensity of the spectrum (3). Protein concentration is 20 mg/ml in distilled water. Curve (1) is approximated by sigmoid line; the initial parts of curves (2) and (3) are approximated by straight lines to show the deviation of the dependences from linearity at temperatures above 320 K (47 °C). This figure and the following ones show the values of the spectral characteristics normalized to the initial values at minimum temperatures

в водных растворах растет практически линейно с температурой вследствие уменьшения концентрации кислорода в растворе, который уширяет спектр ЭПР при пониженных температурах (до температур замедления воды) и снижает его интенсивность. При этом ширина линии с уменьшением температуры растет. Однако интегральная интенсивность спектра, получаемая в результате двойного интегрирования, как и интенсивность центральной линии, растет линейно с повышением температуры. Так, кривая 3 на рис. 3 характеризует линейное увеличение интегральной интенсивности спектра ЭПР спин-зонда 5DSA, связанного с наночастицами ШУ, во всем исследованном температурном диапазоне. Значительный разброс данных при температурах 295–310 К обусловлен высоким отношением сигнал/шум для дисперсии ШУ, сорбционная емкость которой

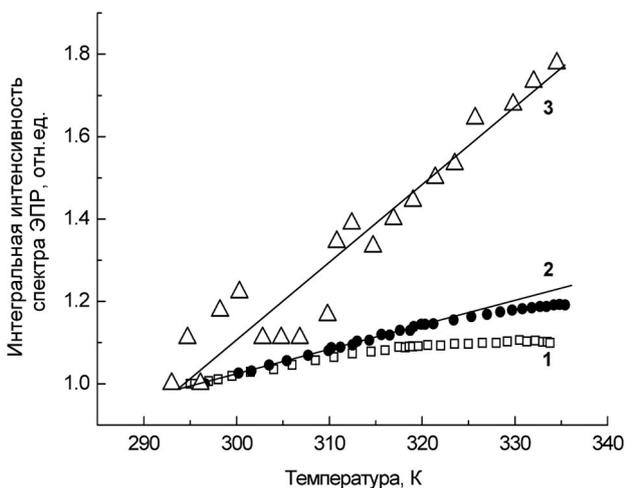


Рис. 3. Температурные зависимости интегральной интенсивности спектров ЭПР спин-зонда на основе доксилстеариновой кислоты (5DSA): (1) спин-зонд, связанный с молекулами сывороточного альбумина человека (САЧ); (2) то же в присутствии наночастиц углерода шунгита (ШУ); (3) спин-зонд, связанный с наночастицами ШУ. Концентрация наночастиц ШУ в дисперсии – 0,01 мг/мл; концентрация белка в водном растворе 25 мг/мл. Кривая 3 и начальные участки кривых 1 и 2 аппроксимированы прямыми, чтобы показать отклонение зависимостей от линейности при температурах выше 315 К (42 °С)

Fig. 3. Temperature dependences of the integral intensity of the EPR spectrum of doxylstearic acid spin probe (5DSA): (1) spin probe associated with human serum albumin (HSA) molecules; (2) the same in presence of shungite carbon (ShC) nanoparticles; (3) spin probe associated with ShC nanoparticles. Concentration of ShC nanoparticles in dispersion is 0.01 mg/ml; protein concentration in dispersion 25 mg/ml. Curve 3 and the initial parts of curves 1 and 2 are approximated by straight lines to show the deviation of the dependences from linearity at temperatures above 315 K (42 °C)

при концентрации ШУ 0,1 мг/мл значительно ниже, чем дисперсии альбумина при концентрации 25 мг/мл. Кривые 1 и 2 на рис. 3, отражающие поведение интегральной интенсивности спектра ЭПР спин-зонда, связанного с белком, отклоняются от линейности в сторону уменьшения при температурах выше 315 К (42 °С) как при отсутствии, так и в присутствии ШУ. Отклонения обусловлены уменьшением числа спин-зондов в парамагнитном состоянии вследствие восстановления доксильной NO-группы зонда и превращения в диамагнитный гидроксилламин. Это происходит в результате взаимодействия NO-группы зонда с SH-группой Цис-34 альбумина [Wetzel et al., 1980]. Однако в присутствии ШУ отклонение выражено в значительно меньшей степени, чем при его отсутствии.

На рис. 4 представлены данные о влиянии наночастиц ШУ на температурные зависимости интегральной интенсивности спектров ЭПР 5DSA, связанных с альбумином человека в солевом растворе при концентрациях белка, отличающихся в два раза, и различных pH. Здесь вновь имеет место отклонение зависимостей от линейного термоактивационного роста интегральной интенсивности, связанного с повышением подвижности зонда, в сторону меньших значений. Оно начинается для концентрации СА 25 мг/мл (рис. 4, а) от температур 313–315 К (40–42 °С) и особенно заметно при температурах выше 325 К (52 °С). При температуре около 42 °С и физиологическом pH в СА имеет место конформационный переход, сопряженный с частичным раскрытием полости, где находится Цис-34 [Rezaei-Tavirani et al., 2006; Iosin et al., 2011]. Для концентрации 50 мг/мл (рис. 4, б), более близкой к физиологическим значениям, характерным для сыворотки крови, отклонение происходит на 7–10 градусов ниже – в диапазоне 308–320 К (35–47 °С), куда входят и физиологические температуры. Изломы на зависимостях для 50 мг/мл, определяемые путем линейной аппроксимации отдельных участков кривых, соответствуют термоиндуцированным конформационным переходам СА. И в этом случае отклонение, вероятно, связано со снижением числа спин-зондов в парамагнитном состоянии вследствие восстановления доксильной NO-группы зонда до диамагнитного гидроксилламина при взаимодействии с SH-группой Цис-34 альбумина. Так может проявляться повышение доступности Цис-34 для нитроксильной группы 5DSA при раскрытии полости Цис-34 в ходе конформационного перехода. При этом NO-группа зонда начинает восстанавливаться до

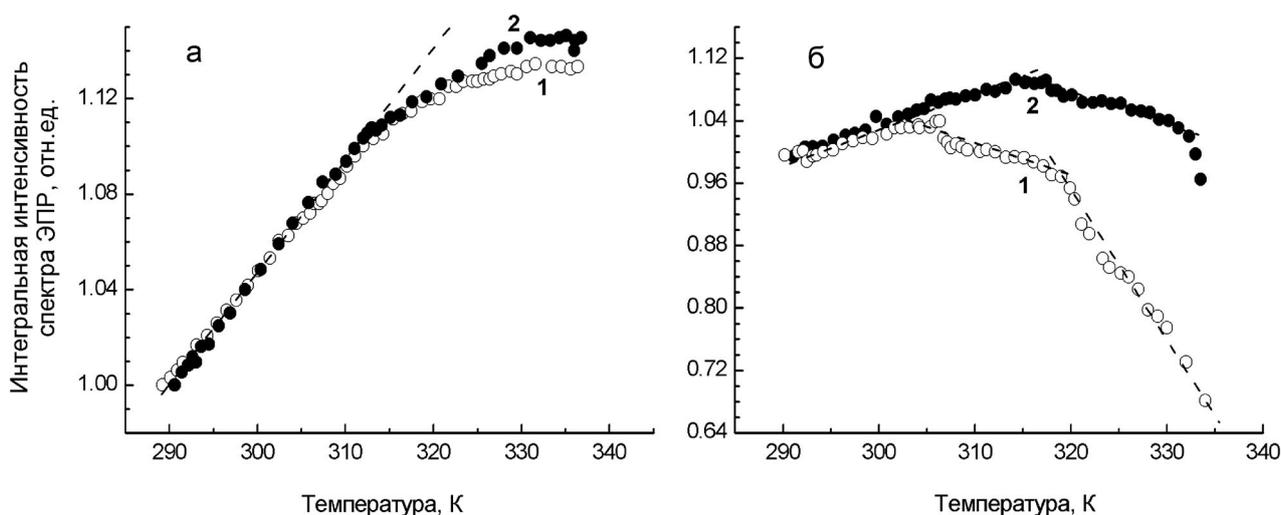


Рис. 4. Температурные зависимости интегральной интенсивности спектра ЭПР спин-зонда на основе доксилстеариновой кислоты (5DSA), связанной с молекулами сывороточного альбумина человека (САЧ), при отсутствии (1) и в присутствии наночастиц углерода шунгита (ШУ) в растворе белка: а) концентрация белка в водном растворе 25 мг/мл, 0,01 М фосфатный буфер, 0,15 М NaCl, pH 7,4, отношение зонд/белок 2,5; б) концентрация белка 50 мг/мл, 0,1 М NaCl, pH 6, отношение зонд/белок 1. Концентрация наночастиц ШУ в водной дисперсии – 0,01 мг/мл. Участки кривых аппроксимированы прямыми, чтобы показать отклонение зависимостей от линейности и термоиндуцированные переходы

Fig. 4. Temperature dependences of the integral intensity of the EPR spectrum of doxylstearic acid spin probe (5DSA) associated with human serum albumin (HSA) molecules in absence (1) and in presence (2) of shungite carbon (ShC) nanoparticles in protein solution: a) protein concentration in water solution 25 mg/ml, 0.01 M PBS, 0.15 M NaCl, pH 7.4, ratio spin-probe/protein equals 2.5; b) protein concentration 50 mg/ml, 0.1 M NaCl, pH 6; ratio spin-probe/protein equals 1. Concentration of ShC nanoparticles in dispersion is 0.01 mg/ml. The segments of curves are approximated by straight lines to show the deviation of the dependences from linearity and thermoinduced transitions

гидроксиламина либо при ее диффузии между центрами посадки [Muravsky et al., 2009], либо, что более вероятно, при взаимодействии 5DSA и Цис-34, находящихся на разных молекулах белка. Образование белковой короны вокруг наночастиц ШУ может приводить к тому, что конформационный переход происходит в диапазоне 5–7 градусов [Tsai et al., 2011].

Данные также свидетельствуют о выраженной зависимости термоиндуцированных конформационных переходов, сопряженных с окислением Цис-34, от условий эксперимента (концентрация белка, зонда, состава растворителя). Так, степень снижения интегральной интенсивности, отражающей степень восстановления зонда с ростом температуры, значительно увеличивается при повышении концентрации белка в два раза (рис. 4, б). Это согласуется с предложенным объяснением эффекта окислением Цис-34: больше белка – значит, больше Цис-34, значит, больше восстановленного спин-зонда.

Так же, как и по данным рис. 3, отклонение от линейности на рис. 4 выражено в меньшей степени в присутствии наночастиц ШУ в белковом растворе. Этот эффект также существенно более выражен при большей концентрации

белка (рис. 4, б). Под влиянием взаимодействия с наночастицами ШУ переходы СА сдвигаются при концентрации СА 50 мг/мл вверх по шкале температур на 7–10 градусов. Предотвращение сопряженных с ними процессов потери парамагнетизма спин-зондов в присутствии наночастиц ШУ проявляется в этих условиях особенно ярко.

На рис. 5 показано изменение со временем в течение 60 минут числа парамагнитных центров в растворе САЧ при отсутствии и в присутствии наночастиц ШУ при температуре 62 °С. Данные указывают, что в присутствии ШУ скорость уменьшения числа парамагнитных центров значительно ниже, чем в растворе белка без ШУ. Это согласуется с данными рис. 3 и 4.

Ранее нами было показано, что наночастицы углерода, в том числе ШУ, способны вызывать концентрационно-зависимое окисление гемоглобина в растворе [Горюнов, Борисова, 2014]. Это позволяет считать, что и в данном случае наночастицы ШУ могут выступать по отношению к Цис-34 в качестве окислителя наряду со спин-зондом, что приводит к снижению степени восстановления спин-зонда в присутствии ШУ. Из выраженной зависимости эффектов окисления Цис-34 и восстановления зонда

Влияние наночастиц углерода шунгита (ШУ) на параметры спектра ЭПР спин-зонда (доксилстеариновой кислоты), связанного с молекулами сывороточного альбумина человека (САЧ), при периодическом отжиге водных дисперсий

Effect of shungite carbon (ShC) nanoparticles on the parameters of the EPR spectrum of the spin probe (doxyl stearic acid), associated with human serum albumin (HSA) molecules, during periodic annealing of aqueous dispersions

Условия отжига Annealing conditions		18 °C	72 °C (180 с) и охлаждение до 18 °C 72 °C (180 s) and cooling to 18 °C			61 °C (180 с) и 120 час по охлаждению до 18 °C 61 °C (180 s) and 120 hrs after cooling to 18 °C
			сразу immed	12 час 12 hrs	96 час 96 hrs	
I, 10 ⁹ Отн. ед. Arb. units	САЧ HSA	0,96	0,79	0,78	0,78	0,96
	САЧ+ШУ HSA+ ShC	0,96	0,83	-	0,78	0,96
A/B	САЧ HSA	7,7	2,3	2,7	6,2	1,4
	САЧ+ШУ HSA+ ShC	7,7	2,4	-	5,1	1,4

Примечание. I – относительная интегральная интенсивность спектра ЭПР (ст. погрешн. $\pm 2 \cdot 10^7$); A/B – отношение амплитуд (интенсивностей) A и B компонент спектра (ст. погрешность 0,1).

Note. I is the relative integral intensity of the EPR spectrum; A/B – ratio of the amplitudes (intensities) of A and B spectrum components.

в присутствии наночастиц ШУ от концентрации белка можно сделать еще два важных вывода. Во-первых, способность спин-зонда и наночастиц ШУ окислять Цис-34 сравнима при данном соотношении белок/спин-зонд/ШУ. Во-вторых, количество центров на наночастицах ШУ при концентрации 0,01 мг/мл, способных восстанавливаться за счет окисления Цис-34, имеет тот же порядок величины, что и концентрация спин-зонда в нашем эксперименте (примерно 0,001 М), поскольку эти центры реагируют своим восстановлением на повышение концентрации белка в два раза в той же степени, что и спин-зонды (рис. 4). Кроме того, эти результаты дают основания считать, что именно изменение окислительно-восстановительного баланса совокупности молекул СА в растворе или дисперсии приводит к смещению конформационных переходов в СА по температурной шкале, как об этом упоминалось выше.

Поскольку наблюдаемые эффекты связаны с предденатурационными конформационными изменениями СА, необходимо рассмотреть, как сказывается на восстановлении спин-зонда 5DSA более глубокая денатурация белка. В таблице приведены данные по изменению числа парамагнитных центров и отношения интенсивностей A и B компонент спектра ЭПР спин-зонда 5DSA, связанного с молекулами СА, полученные в процессах периодического отжига растворов альбумина путем нагрева и последующего охлаждения при отношении зонд/белок более 2:1.

Из данных таблицы и рис. 5 следует, что после первого отжига число спин-зондов в парамагнитном состоянии уменьшается; в присут-

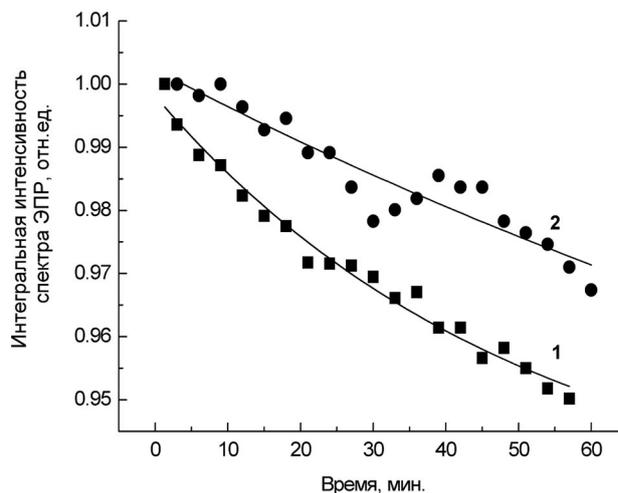


Рис. 5. Кинетика интегральной интенсивности спектра ЭПР спин-зонда на основе доксилстеариновой кислоты (5DSA), связанной с молекулами сывороточного альбумина человека (САЧ), для (1) раствора САЧ, (2) раствора САЧ с наночастицами углерода шунгита (ШУ). Концентрация наночастиц ШУ в дисперсии – 0,01 мг/мл; концентрация белка 25 мг/мл. 0,01 М фосфатный буфер, 0,15 М NaCl, pH 7,4. Температура 335 К (62 °C). Отношение зонд/белок 2

Fig. 5. Kinetics of the integral intensity of the EPR spectrum of doxylstearic acid spin probe (5DSA) associated with human serum albumin (HSA) molecules for (1) HSA solution, (2) HSA solution with nanoparticles of shungite carbon (ShC). Concentration of ShC in dispersion is 0.01 mg/ml, protein concentration 25 mg/ml. 0.01 M PBS, pH 7.4. Temperature is 335 K (62 °C). Ratio spin-probe/protein equals 2

ствии же ШУ это снижение заметно меньше (0,79 и 0,83 соответственно). Возможно, это связано с ограничением подвижности 5DSA

при образовании белковой короны и, соответственно, взаимодействия NO-группы зонда с SH-группами белка. При последующем варьировании температуры заметных изменений числа парамагнитных зондов не происходит, в том числе и в присутствии ШУ. Очевидно, доминирующим явлением в этом случае становится агрегация белка. При этом растет вклад В-компоненты в присутствии ШУ после 4-дневной экспозиции при 18 °С (А/В = 6,2 против А/В = 5,1). Это может быть связано с переходом части молекул 5DSA с белка на наночастицы углерода, поскольку влияние наночастиц ШУ на температуру конформационных переходов может отражаться и на степени сродства 5DSA к белку. Такой переход способен предотвращать восстановление NO-групп зонда до гидросиламина SH-группами Цис-34.

Часто температурные зависимости параметров спектров ЭПР зондов, связанных с белком, имеют отклонения от линейности [Morissett et al., 1974] либо аномалии [Кузнецов, 1976; Рожков, Кяйвяряйнен, 1985]. Они могут быть обусловлены влиянием по крайней мере трех основных обстоятельств: 1) конформационными изменениями в области локализации зонда; 2) образованием олигомеров в результате поперечных сшивок молекул белка в процессе окисления SH-групп, 3) фазовым переходом типа жидкость-жидкость, сопряженным с развитием флуктуаций концентрации и образованием белковых кластеров [Рожков, 1988; San Biagio et al., 1999]. Относительные вклады этих процессов зачастую тесно взаимосвязаны и сопряжены как с изменением белок-белкового взаимодействия, так и с образованием агрегатов. Мы ограничили задачу данной работы рассмотрением тех аспектов эксперимента, которые имеют непосредственное отношение к термоиндуцированным конформационным переходам белка и влиянию на них наночастиц ШУ. Также сделан акцент на том, какое проявление конформационные переходы СА могут получить в условиях взаимодействия с наночастицами ШУ, как они могут дополнительно высветить воздействие НЧ ШУ на СА.

Заключение

Представленные результаты показывают, что ШУ способен оказывать заметное влияние на конформационные переходы СА, связанные с частичным разворачиванием структуры белка и изменением экспонированности аминокислотного остатка Цис-34 домена I, что продемонстрировано для двух типов СА – человека и быка. Это проявляется, с одной стороны,

в снижении выраженности соответствующих температурных переходов на зависимостях параметров спектра ЭПР, а с другой, в повышении температуры переходов на 5–10 °С. При этом ШУ выступает как окислитель по отношению к СА и может рассматриваться как агент, способный влиять на степень окисления Цис-34 СА свободными радикалами, как показано в настоящей работе для радикала 5DSA. Наночастицы ШУ и спин-зонды ДСК конкурируют между собой в процессе окисления Цис-34. Это дает основания для использования ШУ для регуляции окислительно-восстановительного баланса совокупности молекул СА в той или иной системе, включая физиологические среды, и требует дополнительных исследований. Обмен белком между короной ШУ и раствором обуславливает обратимый перенос ЖК между альбуминами и ШУ, чему также способствует частичное разворачивание конформации СА с ростом температуры. Сорбция молекул белка наночастицами ШУ может быть фактором окисления СА и влиять на температуру его конформационных изменений, в свою очередь сказывающихся на окислении.

Таким образом, данные по взаимодействию наночастиц ШУ с сывороточными альбуминами подтверждают, что при взаимодействии растворимого белка с наноструктурами углерода возникает целый ряд физиологически потенциально значимых эффектов: от окислительно-восстановительных до конформационных. Среди них – влияние на связывание и обмен лигандов, что представляет интерес как с биомедицинской, так и с природоохранной точки зрения. Сывороточный альбумин, участвуя в транспорте жирных кислот в плазме крови, отличается неполным и переменным насыщением центров их связывания на белке. Изучение взаимодействия СА с таким малоизученным с точки зрения биологических взаимодействий, но все более широко применяемым в различных технологиях наноматериалом, как водная нанодисперсия углерода шунгита, необходимо для выяснения возможностей его использования в целях воздействия на перенос ЖК и окислительно-восстановительные свойства. Одной из наиболее информативных и непосредственных возможностей такого исследования является применение метода ЭПР гидрофобного спин-зонда.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0221-2017-0044).

Литература

- Горюнов А. С., Борисова А. Г. Возможный механизм автоокисления гемоглобина в водных дисперсиях углеродных наноматериалов // Труды КарНЦ РАН. 2014. № 5. С. 71–77.
- Горюнов А. С., Рожков С. П., Суханова Г. А., Борисова А. Г. Термодинамические эффекты взаимодействия сывороточного альбумина с шунгитовым наноглеродом // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 11. С. 33–38. doi: 10.17076/eb428
- Кузнецов А. Н. Метод спинового зонда (основы и применение). М.: Наука, 1976. 209 с.
- Рожкова Н. Н. Наноглерод шунгитов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 100 с.
- Рожков С. П., Горюнов А. С. Структурно-динамические эффекты взаимодействия белка и других биологически значимых молекул с шунгитовым наноглеродом // Труды КарНЦ РАН. 2017. № 5. С. 33–44. doi: 10.17076/eb450
- Рожков С. П., Кяйвярайнен А. И. Изучение гибкости молекул сывороточного альбумина методом спиновой метки // Биофизика. 1985. Т. 30, № 5. С. 772–776.
- Рожков С. П. Спинодаль в концентрированных водно-солевых растворах молекул сывороточного альбумина // Журн. физ. химии. 1988. Т. 62, № 7. С. 1925–1928.
- Шека Е. Ф., Рожкова Н. Н. Шунгит – природный источник наноразмерного восстановленного оксида графена // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 2. С. 89–104. doi: 10.17076/geo264
- Borzova V. A., Markossian K. A., Chebotareva N. A., Kleymenov S. Yu., Poliansky N. B., Muranov K. O., Stein-Margolina V. A., Shubin V. V., Markov D. I., Kurganov B. I. Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin // PLoS ONE. 2016. Vol. 11, iss. 4. P. e0153495. doi: 10.1371/journal.pone.0153495
- Chakraborty S., Joshi P., Shanker V., Ansari Z. A., Singh S. P., Chakrabarti P. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the structure and activity of bovine serum albumin // Langmuir. 2011. Vol. 27, no. 12. P. 7722–7731. doi: 10.1021/la200787t
- Chen Z., Wu D. Spectroscopic studies on the interaction between ZnSe nanoparticles with bovine serum albumin // J. Luminescence. 2012. Vol. 132, no. 11. P. 2968–2974. doi: 10.1016/j.jlumin.2012.06.028
- Couto C., Vitorino R., Daniel-da-Silva A. L. Gold nanoparticles and bioconjugation: a pathway for proteomic applications // Crit. Rev. Biotechnol. 2017. Vol. 37, no. 2. P. 238–250. doi: 10.3109/07388551.2016.1141392
- Esfandfar P., Falahati M., Saboury A. Spectroscopic studies of interaction between CuO nanoparticles and bovine serum albumin // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. Vol. 34, no. 9. P. 1962–1968. doi: 10.1080/07391102.2015.1096213
- Gryzunov Y. A., Arroyo A., Vigne J. L., Zhao Q., Tyurin V. A., Hubel C. A., Gandley R. E., Vladimirov Yu A., Taylor R. N., Kagan V. E. Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants // Arch. Biochem. Biophys. 2003. Vol. 413, no. 1. P. 53–66. doi: 10.1016/S0003-9861(03)00091-2
- Gurachevsky A., Shimanovitch E., Gurachevskaya T., Muravsky V. Intra-albumin migration of bound fatty acid probed by spin label ESR // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. Vol. 360, no. 4. P. 852–856. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.140
- Huang R., Carney R. P., Ikuma K., Stellacci F., Lau B. L. T. Effects of surface compositional and structural heterogeneity on nanoparticle-protein interactions: different protein configurations // ACS Nano. 2014. Vol. 8, no. 6. P. 5402–5412. doi: 10.1021/nn501203k
- Iosin M., Canpean V., Astilean S. Spectroscopic studies on pH- and thermally induced conformational changes of Bovine Serum Albumin adsorbed onto gold nanoparticles // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2011. Vol. 217. P. 395–401. doi: 10.1016/j.jphotochem.2010.11.012
- Junk M. J. N., Spiess H. W., Hinderberger D. DEER in biological multispin-systems: A case study on the fatty acid binding to human serum albumin // J. Magn. Reson. 2011. Vol. 210, no. 2. P. 210–217. doi: 10.1016/j.jmr.2011.03.003
- Kavitha T., Kang I. -K., Park S. -Y. Poly (acrylic acid) – Grafted Graphene Oxide as an Intracellular Protein Carrier // Langmuir. 2014. Vol. 30, no. 1. P. 402–409. doi: 10.1021/la404337d
- Kim J. E., Han T. H., Lee S. H., Kim J. Y., Ahn C. W., Yun J. E., Kim S. O. Graphene Oxide Liquid crystals // Angew. Chem. Int. Ed. 2011. Vol. 50, no. 13. P. 3043–3047. doi: 10.1002/anie.201004692
- Liu J., Cui L., Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications // Acta Biomater. 2013. Vol. 9. P. 9243–9257. doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.016
- Liu J., Fu S., Yuan B., Li Y., Deng Z. Toward a Universal “Adhesive nanosheet” for the assembly of multiple nanoparticles based on a protein-induced reduction/decoration of graphene oxide // J. Am. Chem. Soc. 2010. Vol. 132, no. 21. P. 7279–7281. doi: 10.1021/ja100938r
- Morrisett J. D., Pownall H. J., Gotto A. M. jr. Bovine Serum Albumin. Study of the fatty acid and steroid binding sites using spin-labeled lipids // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 260, no. 7. P. 2487–249
- Muravsky V., Gurachevskaya T., Berezenko S., Schnurr K., Gurachevsky A. Fatty acid binding sites of human and bovine albumins: Differences observed by spin probe ESR // Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2009. Vol. 74, no. 1. P. 42–47. doi: 10.1016/j.saa.2009.05.003
- Ni Y., Zhanga F., Kokot S. Graphene oxide as a nanocarrier for loading and delivery of medicinal drugs and as a biosensor for detection of serum albumin // Anal. Chim. Acta. 2013. Vol. 769. P. 40–48. doi: 10.1016/j.aca.2013.01.038
- Pavičević A., Luo J., Popović-Bijelić A., Mojović M. Maleimido-proxyl as an EPR spin label for the evaluation of conformational changes of albumin // Eur. Biophys. J. 2017. Vol. 46, no. 8. P. 773–787. doi: 10.1007/s00249-017-1257-z
- Pavičević A. A., Popović-Bijelić A. D., Mojović M. D., Šušnjar S. V., Bačić G. G. Binding of Doxyl Stearic Spin Labels to Human Serum Albumin: An EPR

Study // *J. Phys. Chem. B*. 2014. Vol. 118, no. 37. P. 10898–10905. doi: 10.1021/jp5068928

Peters T. All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications. San Diego, CA: Academic Press, 1996. 432 p. doi: 10.1002/food.19970410631

Rajeshwari A., Pakrashi S., Madhumita S. D. et al. Spectroscopic studies on the interaction of bovine serum albumin with Al₂O₃ nanoparticles // *J. Luminescence*. 2014. Vol. 145. P. 859–865. doi: 10.1016/j.jlumin.2013.08.073

Rezaei-Tavirani M., Moghaddamnia S. H., Ranjbar B., Amani M., Marashi S.-A. Conformational study of human serum albumin in pre-denaturation temperatures by differential scanning calorimetry, circular dichroism and UV spectroscopy // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2006. Vol. 39, no. 5. P. 530–536. doi: 10.5483/BMBRep.2006.39.5.530

Roy S., Das T. K. Spectroscopic studies of interaction between biologically synthesized silver nanoparticles and bovine serum albumin // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014. Vol. 14, no. 7. P. 4899–4905. doi: 10.1166/jnn.2014.9508

Rozhkova N. N., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Natural graphene based shungite nanocarbon // Carbon nanomaterials sourcebook. Graphene, fullerenes, nanotubes, and nanodiamond. Vol. I / Ed. K. D. Sattler. Boca Raton, CRC Press Taylor and Francis Group, 2016. P. 153–176. doi: 10.1201/b19679-9

San Biagio P. L., Martorana V., Emanuele A., Vaiana S. M., Bulone D., Palma M. U. Interacting processes in protein coagulation // *Proteins*. 1999. Vol. 37, no. 1. P. 116–120. doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(19991001)37:1<116::AIDPROT11

Sancataldo G., Vetri V., Fodera` V., Di Cara G., Militello V., Leone M. Oxidation Enhances Human Serum Albumin Thermal Stability and Changes the Routes of Amyloid Fibril Formation // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 1. P. e84552. doi: 10.1371/journal.pone.0084552

Stankovich S., Dikin D. A., Piner R. D., Kohlhhaas K. A., Kleinhammes A., Jia Y., Wu Y., Nguyen S. T., Ruoff R. S. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide // *Carbon*. 2007. Vol. 45, no. 7. P. 1558–1565. doi: 10.1016/j.carbon.2007.02.034

Stewart A. J., Blindauer C. A., Berezenko S., Sleep D., Tooth D., Sadler P. J. Role of Tyr84 in control-

ling the reactivity of Cys34 of human albumin // *FEBS J*. 2005. Vol. 272. P. 353–362. doi: 10.1111/j.1742-4658.2004.04474.x

Sun H., Zhao A., Gao N., Li K., Ren J. S., Qu X. G. Deciphering a Nanocarbon-Based Artificial Peroxidase: Chemical Identification of the Catalytically Active and Substrate-Binding Sites on Graphene Quantum Dots // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015. Vol. 54. P. 7176–7180. doi: 10.1002/anie.201500626

Takabayashi K., Imada T., Saito Y., Inada Y. Coupling between fatty acid binding and sulfhydryl oxidation in bovine serum albumin // *Eur. J. Biochem.* 1983. Vol. 136, no. 2. P. 291–295. doi: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07740.x

Treuel L., Brandholt S., Maffre P., Wiegele S., Shang L., Nienhaus G. U. Impact of Protein Modification on the Protein Corona on Nanoparticles and Nanoparticle-Cell Interactions // *ACS Nano*. 2014. Vol. 8, no. 1. P. 503–513. doi: 10.1021/nn405019v

Tsai D. H., Del Rio F. W., Keene A. M., Tyner K. M., MacCuspie R. I., Cho T. J., Zachariah M. R., Hackley V. A. Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods // *Langmuir*. 2011. Vol. 27, no. 6. P. 2464–2477. doi: 10.1021/la104124d

Turell L., Radic R., Alvarez B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. Vol. 65. P. 244–253. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050

Wang Z., Zhu W., Qiu Y., Yi X., von dem Bussche A., Kane A., Gao H., Koski K., Hurt R. Biological and environmental interactions of emerging two-dimensional nanomaterials // *Chem. Soc. Rev.* 2016. Vol. 45, no. 6. P. 1750–1780. doi: 10.1039/c5cs00914f

Wetzel R., Becker M., Behlke J., Billwitz H., Bohm S., Ebert B., Hamann H., Krumbiegel J., Lassmann G. Temperature Behaviour of Human Serum Albumin // *Eur. J. Biochem.* 1980. Vol. 104, no. 2. P. 469–478. doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04449.x

Zaman M., Ahmad E., Qadeer A., Rabbani G., Khan R. H. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation International // *Int. J. Nanomedicine*. 2014. Vol. 9. P. 899–912. doi: 10.2147/IJN.S54171

Поступила в редакцию 24.04.2018

References

Goryunov A. S., Borisova A. G. Vozmozhnyi mekhanizm avtookisleniya gemoglobina v vodnykh dispersiyakh uglerodnykh nanomaterialov [Probable mechanism of haemoglobin autoxidation in water dispersions of carbon based nanomaterials]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2014. No. 5. P. 71–77.

Goryunov A. S., Rozhkov S. P., Sukhanova G. A., Borisova A. G. Termodinamicheskie efekty vzaimodeistviya syvorotochnogo al'bmina s shungitovym nanouglerodom [Thermodynamic effects of serum albumin interaction with shungite nanocarbon]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2016. No. 11. P. 33–38. doi: 10.17076/eb428

Kuznetsov A. N. Metod spinovogo zonda (osnovy i primeneniye) [Method of spin probe (bases and application)]. Moscow: Nauka, 1976. 209 p.

Rozhkova N. N. Nanouglerod shungitov [The nanocarbon of shungites]. Petrozavodsk: KarRC RAS, 2011. 100 p.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Strukturno-dinamicheskie efekty vzaimodeistviya belka i drugikh biologicheskikh znachimykh molekul s shungitovym nanouglerodom [Structural dynamic effects of protein and other biologically significant molecules' interaction with shungite nanocarbon]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2017. No. 5. P. 33–44. doi: 10.17076/eb450

- Rozhkov S. P., Kaivarainen A. Izuchenie gibkosti molekul syvorotochnogo albumina metodom spinovoi metki [Study of the flexibility of serum albumin molecules by the spin label method]. *Biofizika* [Biophysics]. 1985. Vol. 30, no. 5. P. 772–776.
- Rozhkov S. P. Spinodal' v kontsentrirovannykh vodno-solevykh rastvorakh molekul syvorotochnogo al'bumina [Spinodal in concentrated aqueous-salt solutions of serum albumin molecules]. *Zhurn. fiz. khimii* [J. Physical Chem.]. 1988. Vol. 62, no. 7. P. 1925–1928.
- Sheka E. F., Rozhkova N. N. Shungit – prirodnyi istochnik nanorazmernogo vosstanovlennogo oksida grafena [Shungite is the nature source of nanosize reduced graphene oxide]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2016. No. 2. P. 89–104. doi: 10.17076/geo264
- Borzova V. A., Markossian K. A., Chebotareva N. A. Kleymenov S. Yu., Poliansky N. B., Muranov K. O., Stein-Margolina V. A., Shubin V. V., Markov D. I., Kurganov B. I. Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin. *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11, iss. 4. P. e0153495. doi:10.1371/journal.pone.0153495
- Chakraborty S., Joshi P., Shanker V., Ansari Z. A., Singh S. P., Chakrabarti P. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the structure and activity of bovine serum albumin. *Langmuir*. 2011. Vol. 27, no. 12. P. 7722–7731. doi: 10.1021/la200787t
- Chen Z., Wu D. Spectroscopic studies on the interaction between ZnSe nanoparticles with bovine serum albumin. *J. Luminescence*. 2012. Vol. 132, no. 11. P. 2968–2974. doi: 10.1016/j.jlumin.2012.06.028
- Couto C., Vitorino R., Daniel-da-Silva A. L. Gold nanoparticles and bioconjugation: a pathway for proteomic applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017. Vol. 37, no. 2. P. 238–250. doi: 10.3109/07388551.2016.1141392
- Esfandfar P., Falahati M., Saboury A. Spectroscopic studies of interaction between CuO nanoparticles and bovine serum albumin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2016. Vol. 34, no. 9. P. 1962–1968. doi: 10.1080/07391102.2015.1096213
- Gryzunov Yu. A., Arroyo A., Vigne J. L., Zhao Q., Tyurin V. A., Hubel C. A., Gandle R. E., Vladimirov Yu. A., Taylor R. N., Kagan V. E. Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. Vol. 413, no. 1. P. 53–66. doi: 10.1016/S0003-9861(03)00091-2
- Gurachevsky A., Shimanovitch E., Gurachevskaya T., Muravsky V. Intra-albumin migration of bound fatty acid probed by spin label ESR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 360, no. 4. P. 852–856. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.140
- Huang R., Carney R. P., Ikuma K., Stellacci F., Lau B. L. T. Effects of surface compositional and structural heterogeneity on nanoparticle-protein interactions: different protein configurations. *ACS Nano*. 2014. Vol. 8, no. 6. P. 5402–5412. doi: 10.1021/nn501203k
- Iosin M., Canpean V., Astilean S. Spectroscopic studies on pH- and thermally induced conformational changes of Bovine Serum Albumin adsorbed onto gold nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2011. Vol. 217. P. 395–401. doi: 10.1016/j.jphotochem.2010.11.012
- Junk M. J. N., Spiess H. W., Hinderberger D. DEER in biological multispin-systems: A case study on the fatty acid binding to human serum albumin. *J. Magn. Reson.* 2011. Vol. 210, no. 2. P. 210–217. doi: 10.1016/j.jmr.2011.03.003
- Kavitha T., Kang I.-K., Park S.-Y. Poly (acrylic acid) – Grafted Graphene Oxide as an Intracellular Protein Carrier. *Langmuir*. 2014. Vol. 30, no. 1. P. 402–409. doi: 10.1021/la404337d
- Kim J. E., Han T. H., Lee S. H., Kim J. Y., Ahn C. W., Yun J. E., Kim S. O. Graphene Oxide Liquid crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011. Vol. 50, no. 13. P. 3043–3047. doi: 10.1002/anie.201004692
- Liu J., Cui L., Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater.* 2013. Vol. 9. P. 9243–9257. doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.016
- Liu J., Fu S., Yuan B., Li Y., Deng Z. Toward a Universal «Adhesive Nanosheet» for the Assembly of Multiple Nanoparticles Based on a Protein-Induced Reduction/Decoration of Graphene Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* 2010. Vol. 132, no. 21. P. 7279–7281. doi: 10.1021/ja100938r
- Morrisett J. D., Pownall H. J., Gotto A. M. jr. Bovine Serum Albumin. Study of the fatty acid and steroid binding sites using spin-labeled lipids. *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 260, no. 7. P. 2487–2494.
- Muravsky V., Gurachevskaya T., Berezenko S., Schnurr K., Gurachevsky A. Fatty acid binding sites of human and bovine albumins: Differences observed by spin probe ESR. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2009. Vol. 74, no. 1. P. 42–47. doi: 10.1016/j.saa.2009.05.003
- Ni Y., Zhanga F., Kokot S. Graphene oxide as a nanocarrier for loading and delivery of medicinal drugs and as a biosensor for detection of serum albumin. *Anal. Chim. Acta*. 2013. Vol. 769. P. 40–48. doi: 10.1016/j.aca.2013.01.038
- Pavičević A., Luo J., Popović-Bijelić A., Mojović M. Maleimido-proxyl as an EPR spin label for the evaluation of conformational changes of albumin. *Eur. Biophys. J.* 2017. Vol. 46, no. 8. P. 773–787. doi: 10.1007/s00249-017-1257-z
- Pavičević A. A., Popović-Bijelić A. D., Mojović M. D., Šušnjar S. V., Bačić G. G. Binding of Doxyl Stearic Spin Labels to Human Serum Albumin: An EPR Study. *J. Phys. Chem. B*. 2014. Vol. 118, no. 37. P. 10898–10905. doi: 10.1021/jp5068928
- Peters T. All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications. San Diego, CA: Academic Press, 1996. 432 p. doi: 10.1002/food.19970410631
- Rajeshwari A., Pakrashi S., Madhumita S. D. et al. Spectroscopic studies on the interaction of bovine serum albumin with Al₂O₃ nanoparticles. *J. Luminescence*. 2014. Vol. 145. P. 859–865. doi: 10.1016/j.jlumin.2013.08.073
- Rezaei-Tavirani M., Moghaddamnia S. H., Ranjbar B., Amani M., Marashi S.-A. Conformational study of human serum albumin in pre-denaturation temperatures by differential scanning calorimetry, circular dichroism and UV spectroscopy. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2006. Vol. 39, no. 5. P. 530–536. doi: 10.5483/BMBRep.2006.39.5.530
- Roy S., Das T. K. Spectroscopic studies of interaction between biologically synthesized silver nanopar-

ticles and bovine serum albumin. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014. Vol. 14, no. 7. P. 4899–4905. doi: 10.1166/jnn.2014.9508

Rozhkova N. N., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Natural graphene based shungite nanocarbon. *Carbon nanomaterials sourcebook. Graphene, fullerenes, nanotubes, and nanodiamond.* Vol. I. 2016. P. 153–176. doi: 10.1201/b19679-9

San Biagio P. L., Martorana V., Emanuele A., Vaiana S. M., Bulone D., Palma M. U. Interacting processes in protein coagulation. *Proteins.* 1999. Vol. 37, no. 1. P. 116–120. doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(19991001)37:1<116::AIDPROT11

Sancataldo G., Vetri V., Fodera V., Di Cara G., Militello V., Leone M. Oxidation Enhances Human Serum Albumin Thermal Stability and Changes the Routes of Amyloid Fibril Formation. *PLoS ONE.* 2014. Vol. 9, no. 1. P. e84552. doi:10.1371/journal.pone.0084552

Stankovich S., Dikin D. A., Piner R. D., Kohlhaas K. A., Kleinhammes A., Jia Y., Wu Y., Nguyen S. T., Ruoff R. S. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon.* 2007. Vol. 45, no. 7. P. 1558–1565. doi: 10.1016/j.carbon.2007.02.034

Stewart A. J., Blindauer C. A., Berezenko S., Sleep D., Tooth D., Sadler P. J. Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin. *FEBS J.* 2005. Vol. 272. P. 353–362. doi: 10.1111/j.1742-4658.2004.04474.x

Sun H., Zhao A., Gao N., Li K., Ren J. S., Qu X. G. Deciphering a Nanocarbon-Based Artificial Peroxidase: Chemical Identification of the Catalytically Active and Substrate-Binding Sites on Graphene Quantum Dots. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015. Vol. 54. P. 7176–7180. doi: 10.1002/anie.201500626

Takabayashi K., Imada T., Saito Y., Inada Y. Coupling between fatty acid binding and sulfhydryl oxidation in bovine serum albumin. *Eur. J. Biochem.* 1983. Vol. 136, no. 2. P. 291–295. doi: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07740.x

Treuel L., Brandholt S., Maffre P., Wiegele S., Shang L., Nienhaus G. U. Impact of Protein Modification on the Protein Corona on Nanoparticles and Nanoparticle-Cell Interactions. *ACS Nano.* 2014. Vol. 8, no. 1. P. 503–513. doi: 10.1021/nn405019v

Tsai D. H., Del Rio F. W., Keene A. M., Tyner K. M., MacCuspie R. I., Cho T. J., Zachariah M. R., Hackley V. A. Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods. *Langmuir.* 2011. Vol. 27, no. 6. P. 2464–2477. doi: 10.1021/la104124d

Turell L., Radic R., Alvarez B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic. Biol. Med.* 2013. Vol. 65. P. 244–253. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050

Wang Z., Zhu W., Qiu Y., Yi X., von dem Bussche A., Kane A., Gao H., Koski K., Hurt R. Biological and environmental interactions of emerging two-dimensional nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 2016. Vol. 45, no. 6. P. 1750–1780. doi: 10.1039/c5cs00914f

Wetzel R., Becker M., Behlke J., Billwitz H., Bohm S., Ebert B., Hamann H., Krumbiegel J., Lassmann G. Temperature Behaviour of Human Serum Albumin. *Eur. J. Biochem.* 1980. Vol. 104, no. 2. P. 469–478. doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04449.x

Zaman M., Ahmad E., Qadeer A., Rabbani G., Khan R. H. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation International. *Int. J. Nanomedicine.* 2014. Vol. 9. P. 899–912. doi: 10.2147/IJN.S54171

Received April 24, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Рожков Сергей Павлович

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: rozhkov@krc.karelia.ru

Горюнов Андрей Сергеевич

ведущий научный сотрудник, к. ф. -м. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: goryunov@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 765264

CONTRIBUTORS:

Rozhkov, Sergey

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

Goryunov, Andrey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: goryunov@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 765264

УДК 597 + 577.1

ДИНАМИКА ЛИПИДОВ И НЕКОТОРЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МЫШЦАХ ТРЕХИГЛОЙ КОЛЮШКИ БЕЛОГО МОРЯ ПРИ КРАТКОСРОЧНОМ ГОЛОДАНИИ И ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ПИТАНИЯ

**А. Е. Бахвалова¹, С. А. Мурзина², В. П. Воронин², С. Н. Пеккоева²,
Т. Р. Руоколайнен², Д. Л. Лайус¹, Т. С. Иванова¹, Н. Н. Немова²**

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

² Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

Проведено исследование сравнительной динамики липидов и некоторых жирных кислот в мышцах половозрелых самок и самцов колюшки трехиглой из Белого моря при ее аквариальном содержании в условиях экспериментального кратковременного голодания и последующего возобновления питания при разных режимах кормления. Наиболее существенные различия и избирательность использования липидов продемонстрированы между самками и самцами рыб в процессе аквариального эксперимента, включающего их голодание и разные режимы питания. Полученные результаты свидетельствуют о способности метаболических систем мышц самцов колюшки к быстрому восстановлению и накоплению необходимого уровня липидов после прекращения голодания. В мышцах самок уровень общих липидов при голодании изменяется за счет первоочередного использования энергетических липидов до их полной утилизации, а также отдельных структурных липидов. Увеличение уровня холестерина в мышцах самцов и самок в условиях голодания и при возобновлении питания может указывать на возможное усиление глюконеогенеза и повышение резистентности организма. Установлена специфичность расщепления отдельных физиологически значимых полиненасыщенных жирных кислот – докозагексаеновой у самцов и эйкозапентаеновой у самок, что, скорее всего, связано с их особой физиологической ролью, которую они выполняют в организме рыб. Показано, что временные изменения для различных липидов и жирных кислот при голодании и исследованных режимах возобновления питания различаются и отражают физиолого-биохимический статус организма, а также функциональную роль и значимость отдельных групп липидов в организме.

Ключевые слова: колюшка трехиглая; Белое море; липиды; жирные кислоты; голодание; питание.

**A. E. Bakhvalova, S. A. Murzina, V. P. Voronin, S. N. Pekkoeva,
T. P. Ruokolainen, D. L. Lajus, T. S. Ivanova, N. N. Nemova. THE
DYNAMICS OF LIPIDS AND SOME FATTY ACIDS IN THE MUSCLES OF THE
WHITE SEA THREESPINE STICKLEBACK DURING SHORT-TERM FASTING
AND UNDER DIFFERENT FEEDING REGIMENS**

The comparative dynamics of lipids and some fatty acids in the muscles of mature females and males of threespine stickleback from the White Sea kept in aquariums under

the conditions of experimental short-term fasting and subsequent renewal of nutrition under different feeding regimens was studied. The most significant differences and the selectivity of lipid utilization are demonstrated between females and males in the process of an aquarium experiment, including their fasting and various dietary regimens. The results indicate the ability of the metabolic systems of male stickleback muscles to rapidly recover and store the requisite level of lipids after the termination of fasting. The relatively constant level of total lipids during fasting in the muscles of females can be explained by its maintenance due to the priority, up to the full, use of energy lipids, as well as individual structural lipids. The increase of the cholesterol level in the muscles of males and females during fasting and after the resumption of nutrition is most likely due to increased gluconeogenesis and increased resistance of the organism. A specificity of the expenditure of certain physiologically significant polyunsaturated fatty acids was observed – docosahexaenoic in males and eicosapentaenoic in females, most probably due to their special physiological roles in the fish organism. The temporal changes in the content of different lipids and fatty acids during fasting and the investigated feeding resumption regimens differ, reflecting the physiological and biochemical status of the organism, as well as the functional role and significance of individual lipid groups in the organism.

Key words: threespine stickleback; White Sea; lipids; fatty acids; fasting; nutrition.

Введение

Верхние и нижние трофические уровни морских экосистем обычно характеризуются высоким видовым разнообразием, в то время как промежуточный уровень включает небольшое число видов мелких пелагических рыб. При высокой их численности изучение именно этих видов, образующих так называемую «осиную талию» экосистемы, может дать важную информацию для понимания механизмов изменений в экосистемах [Cury et al., 2000]. В Белом море к таким видам относятся, например, трехиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* (Linnaeus, 1758). Увеличение ее численности в Белом море на несколько порядков, которое имело место за последние одно-два десятилетия [Лайус и др., 2013; Bakhvalova et al., 2016], привело к тому, что колюшка в настоящее время составляет примерно 95 % численности рыб в прибрежной зоне моря в летний период, когда происходит ее нерест [Ivanova et al., 2016]. Сезонные миграции колюшки из открытой части моря в прибрежную зону и обратно приводят к горизонтальному перемещению вещества и энергии и в определенной степени к качественному и количественному обогащению прибрежных акваторий биогенными компонентами. Состав пищи, ее сбалансированность и доступность обеспечивают и поддерживают процессы роста и развития организма, размножения и формирования численности отдельных поколений в популяциях рыб Белого моря, в том числе колюшки трехиглой. Взрослая колюшка в первой половине лета примерно в течение месяца обитает около берегов, где не только нерестится, но и активно питается, в том числе и собственной икрой. Причем самки питаются

несколько активнее и разнообразнее ухаживающих за гнездом и потомством самцов [Демчук и др., 2018]. Известно, что неотъемлемым звеном жизненного цикла самцов колюшки трехиглой, например, после нереста является неполное голодание, при этом часто нормальная функциональная и двигательная активность сохраняется [Лайус и др., 2013]. В процессе голодания изменяется интенсивность и направленность многих эндогенных взаимосвязанных метаболических реакций и процессов, которые могут иметь в том числе компенсаторный характер, например, при продолжающемся голодании вне физиологического оптимума [Jezierska et al., 1982; Osako et al., 2003]. К числу таких адаптивных биохимических систем относятся липиды и их жирнокислотные компоненты, которые выполняют важные функции в клеточном метаболизме, прежде всего как источник энергетических резервов и субстратов для пластического обмена [Tocher, 2003; Arts et al., 2009]. Липиды играют важную роль в формировании биопродуктивности водных экосистем северных регионов [Møller, 2006]. При этом следует отметить, что характер ответной биохимической реакции с участием липидов на тканевом и клеточном уровнях при изменении или недостатке пищи, в том числе при неполном или полном голодании, колюшки трехиглой остается невыясненным. Исследования изменений липидного статуса и их связи с характером питания разных видов беломорских рыб могут иметь значение при анализе динамики численности стада рыб и межвидовых пищевых взаимоотношений.

Целью настоящей работы было исследование сравнительной динамики липидов и некоторых жирных кислот в мышцах половозрелых самок и самцов колюшки трехиглой из Белого

Таблица 1. Характеристика анализируемого материала трехиглой колюшки Белого моря в природных условиях, во время 7-дневного голодания (1) и при разных режимах питания (8-е (2) и 9-е (3) сутки опыта)

Table 1. Characteristics of the analyzed material of the White Sea threespine stickleback in natural conditions, during the 7-day fasting (1) and under different feeding regimes of nutrition – 8th day (2) and 9th day (3) of the experiment

Режим содержания Regime of fish keeping	Лагуна Колюшковая Lagoon Kolyushkovaya (0)		Аквариальный эксперимент Aquarian experiment					
			(1)		(2)		(3)	
Пол Sex	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Объем выборки Number of samples	8	8	5	5	8	3	7	4
TL	6,7 ± 0,13	6,6 ± 0,04	6,6 ± 0,14	7,0 ± 0,04	6,7 ± 0,13	6,6 ± 0,04	6,6 ± 0,14	7,0 ± 0,04
SL	6 ± 0,14	6,5 ± 0,13	5,9 ± 0,07	6,3 ± 0,27	6 ± 0,12	6,8 ± 0,25	6,3 ± 0,07	6,6 ± 0,29
TW	2,7 ± 0,24	3,4 ± 0,26	2,4 ± 0,07	2,5 ± 0,32	2,4 ± 0,14	2,8 ± 0,24	3,0 ± 0,13	3,1 ± 0,52

Примечание. Общая (TL) и стандартная (SL) длина тела, общая масса тела (TW). Данные представлены в виде $M \pm m$ (выборочная ошибка).

Note. Total (TL) and standard (SL) body length, total body weight (TW). The data are presented in the form $M \pm m$ (selective error).

моря при аквариальном ее содержании в условиях экспериментального кратковременного голодания и последующего возобновления питания при разных режимах кормления.

Материалы и методы

Половозрелые особи (самки и самцы) колюшки трехиглой по завершении нереста (июль) отлавливались с помощью равнокрылого невода длиной 7 м в лагуне Колюшковая (N66°31'32.62", E33°64'59.53") – полуизолированной акватории пролива Сухая Салма (Кандалакшский залив, Белое море). Эта акватория, мелководная и умеренно заросшая zostерой, оценивается как благоприятное нерестилище для колюшки. Соленость в лагуне несколько ниже, чем в море, и составляет 16–18 ‰. Давление со стороны хищников низкое, здесь лишь изредка встречаются керчаковые рыбы, активно потребляющие колюшку [Bakhvalova et al., 2016]. Численность колюшки в июне 2016 г. составляла 33–37 экз./м², при соотношении самцов к самкам 1 : 1,29. В планктоне доминирует копепода *Acartia longiremis* (Н. В. Полякова, неопубликованные данные), а бентос представлен олигохетами и личинками ортокладин, которые являются кормовыми объектами колюшки.

Постановку аквариального эксперимента проводили на базе УНБ СПбГУ «Беломорская». Отловленных рыб помещали в три соединенных между собой аквариума объемом 20 л каждый с проточной системой подачи морской воды с сохранением физических параметров среды (температура и соленость). Среднее значение температуры – 22,5 °С, солености – 17 ‰. Все рыбы голодали в течение 7 дней, после чего они

делились на три группы: 1) голодание в течение 7 дней; 2) 8-е сутки опыта, с питанием в течение 1 ч. после голодания; 3) 9-е сутки опыта, с питанием в течение 24 ч. после голодания. Кормом являлся природный планктон с доминированием в нем копеподы *Acartia longiremis*. Контролем служили рыбы из того же невода, выловленные в Сухой Салме, не подвергавшиеся голоданию.

У каждой особи фиксировались мышцы в 96% этаноле. У рыб измеряли общую (TL) (от рыла до конца хвостового плавника) и стандартную (SL) (от рыла до конца чешуйного покрова) длину тела и определяли общую массу тела (TW). Объем материала представлен в таблице 1.

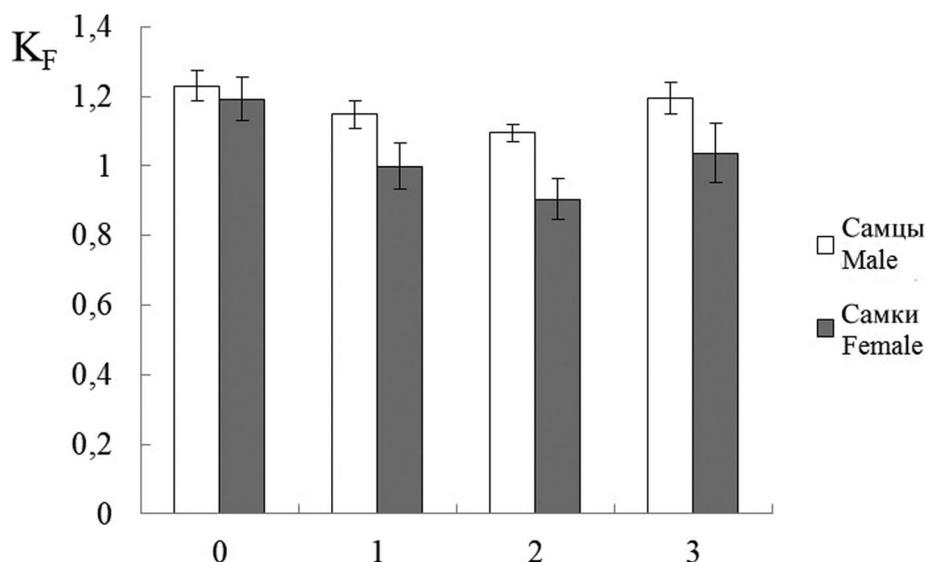
Для всех рыб был определен коэффициент упитанности по формуле Фултона (K_F):

$$K_F = \frac{TW}{SL^3} * 100,$$

где TW – масса рыбы, г; SL – стандартная длина тела, см.

Липидный и жирнокислотный статус мышц самок и самцов колюшки оценивали по содержанию общих липидов (ОЛ), общих фосфолипидов (ФЛ) и их индивидуальных классов – фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилинозитола (ФИ), фосфатидилсерина (ФС), сфингомиелина (СФМ) и лизофосфатидилхолина (ЛФХ), триацилглицеринов (ТАГ), холестерина (ХС), эфиров холестерина (ЭХС) и отдельных жирных кислот (ЖК) общих липидов.

В лаборатории пробы мышц перефиксировали смесью хлороформ : метанол (2 : 1 по объему). Пробы гомогенизировали и липиды экстрагировали по методу Фолча [Folch et al.,



Изменение коэффициента упитанности (K_F) трехиглой колюшки Белого моря в природных условиях (0), во время 7-дневного голодания (1) и при разных режимах питания – 8-е (2) и 9-е (3) сутки опыта

Change in the fatness ratio (K_F) of the white-throat stickleback in the White Sea in natural conditions (0), during the 7-day fasting (1) and under different feeding regimes regimes of nutrition – 8th day (2) and 9th day (3) of the experiment

1957], концентрировали досуха с помощью роторно-вакуумной установки. Выделенные липиды фракционировали на пластинках Silufol (Kavalier, Чехия) в системе растворителей петролейный эфир : серный эфир : уксусная кислота (90 : 10 : 1 по объему). Количественное определение суммарных ФЛ, ТАГ и ЭХС проводили гидроксаматным методом [Walsh et al., 1965; Сидоров и др., 1972], ХС – методом Энгельбрехта [Engelbrecht et al., 1974] и выражали в процентах сухого вещества.

Количественное определение отдельных классов ФЛ (ФХ, ФЭА, ФИ, ФС, СФМ, ЛФХ) проводили методом высокоэффективной газожидкостной хроматографии [Arduini, 1996] на стальной колонке Nucleosil 1007 («Элсико», Россия). Подвижная фаза – ацетонитрил : гексан : метанол : ортофосфорная кислота (918 : 30 : 30 : 17,5). Детектирование проводили по степени поглощения света при 206 нм. Для идентификации отдельных пиков исследуемых фосфолипидов на хроматограмме использовали стандартные растворы ФЛ (Sigma Aldrich, США). Содержание ФЛ-компонентов оценивали по значениям площадей пиков на хроматограмме.

Состав и содержание ЖК общих липидов после метанолиза [Цыганов, 1971] определяли методом газовой хроматографии. Метилвые эфиры ЖК разделяли на хроматографе «Кристалл 5000.2» (ХРОМАТЭК, Россия) с капиллярными колонками ZB-FFP, используя в качестве

внутреннего стандарта бегеновую ЖК (22:0) (Sigma Aldrich, США), хроматограммы обрабатывали с помощью компьютерной программы «Хроматэк Аналитик». ЖК-статус оценивали индивидуально по содержанию отдельных ЖК и их соотношениям.

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программ MS Excel 2010 и Statistica 10.0. Достоверность различий между содержанием липидов у колюшки из разных экспериментов оценивали с помощью критерия Стьюдента (t-test). Для оценки различий по таким показателям, как упитанность, доля ОЛ, ФЛ, ТАГ, ЭХС и ХС (% сухого вещества), у рыб разного пола на разных этапах эксперимента был проведен двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA (фактор 1 – этап эксперимента, фактор 2 – пол рыбы).

Экспериментальная работа проведена с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты

В настоящем исследовании показано, что упитанность самок колюшки достоверно ниже упитанности самцов (рис.), при этом фактор пола вносит достоверные различия ($p = 0,007$; $F = 7,95$) в данный показатель, в то время как этап эксперимента оказывает меньшее влия-

ние ($p = 0,004$; $F = 5,9$). Коэффициент упитанности колюшки при голодании существенно снижался (в большей степени у самцов) по сравнению с особями контрольной группы. При возобновлении питания (8-е сутки) наблюдалось увеличение упитанности у колюшки обоих полов по сравнению с контролем и с рыбами, которые голодали (рис.).

Установлена динамика ОЛ и отдельных липидных классов, в том числе некоторых ключевых ЖК в мышцах самок и самцов трехиглой колюшки, содержащихся в режиме голодания (7 дней) и при возобновлении питания (8-е и 9-е сут. (табл. 2)). Показаны достоверные различия по уровню ОЛ, ФЛ и ТАГ в мышцах самок и самцов рыб, что подтверждается данными дисперсионного анализа ($p = 0,003$; $p = 0,004$; $p = 0,03$ соответственно). Содержание ОЛ, ФЛ и ХС в мышцах колюшки достоверно различается при разных режимах кормления ($p = 0,01$; $p = 0,00001$; $p = 0,00000$ соответственно).

Мышцы, самцы

В мышцах количество ОЛ в период голодания уменьшилось в 1,7 раза (9,41 vs 5,61 % сухого вещества) за счет существенного расходования ТАГ – 2,56 vs 0,33 % сухого вещества, а также общих ФЛ (6,27 и 3,41 %) – преимущественно за счет ФХ, ФЭА, ЛФХ, ФС, СФМ, по сравнению с таковым у особей контрольной группы (в % сухого вещества: 4,47 и 2,39; 1,13 и 0,68; 0,08 и 0,05; 0,19 и 0,13; 0,03 и 0,004 соответственно). При возобновлении питания (8-е сут.) и заборе материала после 1 ч. питания показано дальнейшее снижение уровня ОЛ до 4,7 % сухого вещества, за счет тех же липидов, а также ЭХС (0,35 и 0,04 % сухого вещества). Повышение уровня ОЛ до 6,81 % сухого вещества у рыб, за счет ТАГ и ХС, показано на 9-е сут. при неограниченном питании в течение 24 ч., по сравнению с таковым у самцов из контрольной группы и при голодании. Количество ХС значительно увеличилось у самцов в ходе аквариального эксперимента по сравнению с рыбами из лагуны Колюшковая (0,09 % сухого вещества). Максимальный уровень ХС показан для рыб при голодании – 1,35 % сухого вещества, далее при возобновлении питания (8-е и 9-е сут.) – 0,98 и 1,01 % сухого вещества соответственно. При этом показатель ХС/ФЛ достоверно увеличивался у рыб в аквариальных условиях по сравнению с таковым в мышцах самцов контрольной группы (табл. 2). Следует отметить, что количество ФИ достоверно не изменялось.

Количество ПНЖК, среди которых доминировали ЖК семейства (n-3) за счет 22:6(n-3)

докозагексаеновой кислоты (ДГК) и 20:5(n-3) эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК), а также минорной 22:5(n-3) докозапентаеновой кислоты (ДПК), было наибольшим в ЖК-спектре самцов колюшки контрольной группы (41,97; 22,32; 7,67 и 4,01 % суммы ЖК соответственно). При этом количество ПНЖК семейства (n-6) составляло 4,39 % суммы ЖК, в которых арахидоновая кислота (АРА), 20:4(n-6) – 2,14 % суммы ЖК и 18:2(n-6) – 1,65 %. Второе место по количеству занимали МНЖК (32,95 % суммы ЖК), в которых существенная доля определялась следующими ЖК (в порядке уменьшения) – 18:1(n-9), 20:1(n-9), 18:1(n-7), 22:1(n-11) и 16:1(n-7) (табл. 2). Количество НЖК составляло 25,01 % суммы ЖК, в которых ведущей являлась 16:0 пальмитиновая кислота (15,02 % суммы ЖК), а также 18:0 стеариновая (4,95 % суммы ЖК).

Уровень ПНЖК, в том числе семейства (n-3) и отдельных ЖК – ДГК, в ходе аквариального эксперимента в мышцах самцов достоверно не изменялся по сравнению с контрольной группой, но существенно снижался у рыб при возобновлении питания на 9-е сут. Количество ЭПК (% суммы ЖК) достоверно увеличивалось в мышцах самцов при голодании (10,63) и при возобновлении кормления, 8-е сут. (11,52), по сравнению с таковым у рыб контрольной группы (7,67) и при возобновлении кормления, 9-е сут. (5,17). Содержание 18:3(n-3), 18:4(n-3) и 22:5(n-3) варьировало и было наибольшим в мышцах самцов контрольной группы по сравнению с таковым у рыб при голодании и при двух режимах кормления (табл. 2). Достоверное увеличение количества АРА показано в мышцах самцов при голодании и при возобновлении питания (8-е сут.) по сравнению с таковым у рыб контрольной группы (3,3 и 4,04 vs 2,14 % суммы ЖК соответственно). Уровень АРА у рыб при возобновлении питания (9-е сут.) не отличался от такового в мышцах самцов из контрольной группы – 2,12 и 2,14 % суммы ЖК соответственно. Коэффициент (n-3)/(n-6), характеризующий направление и интенсивность синтеза ЖК данных семейств ПНЖК, снижался у рыб в аквариальном эксперименте и был наименьшим у самцов при возобновлении кормления (9-е сут.) (4,51) по сравнению с таковым у особей из контрольной группы (8,29).

Установлено снижение количества МНЖК за счет 16:1(n-7), 18:1(n-9), 18:1(n-7) и 20:1(n-9) в мышцах самцов во время голодания и при возобновлении питания (8-е сут.) по сравнению с таковым у рыб из контрольной группы и при кормлении (9-е сут.), у которых их уровень не различался (табл. 2).

Таблица 2. Содержание общих липидов и их отдельных классов (общих фосфолипидов, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозитола, сфингомиелина, лизофосфатидилхолина, триацилглицеринов, эфиров холестерина и холестерина) (% сухой массы), а также жирных кислот общих липидов (% суммы ЖК) в мышцах трехиглой колюшки Белого моря в природных условиях, во время 7-дневного голодания (1) и при разных режимах питания – 8-е (2) и 9-е (3) сутки опыта

Table 2. The content of total lipids and their individual classes (total phospholipids, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, sphingomyelin, lysophosphatidylcholine, triacylglycerols, cholesterol esters and cholesterol) (% dry weight), as well as fatty acids of total lipids (% of total FA) in the muscles of the White Sea threespine stickleback in natural conditions, during the 7-day fasting (1) and under different feeding regimes of nutrition – 8th day (2) and 9th day (3) of the experiment

Режим содержания Regime of fish keeping	Лагуна Колюшковая Lagoon Kolyushkovaya (0)		Аквариальный эксперимент Aquarian experiment					
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)		
Длина, см Total length, cm	7,3 ± 0,13	6,7 ± 0,13	7,0 ± 0,26	6,6 ± 0,04	7,4 ± 0,17	6,6 ± 0,14	7,5 ± 0,24	7,0 ± 0,04
Пол Sex	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Число проб Number of samples	8	8	5	5	8	3	7	4
ОЛ TL	9,41 ± 1,3 ²³	5,46 ± 0,58 ⁴	5,61 ± 0,24 ¹³	4,62 ± 0,28	4,7 ± 0,27 ²	5 ± 0,42	6,81 ± 1,32	3,87 ± 0,14 ¹
ФЛ PL	6,27 ± 0,45 ²³⁴	4,34 ± 0,65 ⁴	3,41 ± 0,2 ¹	3 ± 0,23 ⁴	3,63 ± 0,31 ¹	3,54 ± 0,5	3,79 ± 0,52 ¹	2,81 ± 0,37 ²
ФИ PI	0,14 ± 0,02	0,078 ± 0,01 ⁴	0,12 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,03 ± 0,01 ¹
ФС PS	0,19 ± 0,02 ²³⁴	0,14 ± 0,02 ⁴	0,13 ± 0,01 ¹	0,11 ± 0,03	0,13 ± 0,02 ¹	0,14 ± 0,03	0,12 ± 0,02 ¹	0,06 ± 0,01 ¹
ФЗА PEA	1,13 ± 0,08 ²³⁴	0,79 ± 0,13 ⁴	0,68 ± 0,04 ¹⁴	0,55 ± 0,11	0,74 ± 0,08 ¹⁴	0,69 ± 0,07	0,44 ± 0,02 ¹²³	0,41 ± 0,05 ¹
ФХ PC	4,47 ± 0,34 ²³⁴	2,92 ± 0,42	2,39 ± 0,17 ¹	2,17 ± 0,24	2,54 ± 0,21 ¹	2,46 ± 0,39	3,03 ± 0,46 ¹	2,22 ± 0,36
ЛФХ LPC	0,08 ± 0,007 ²⁴	0,101 ± 0,03	0,05 ± 0,008 ¹	0,05 ± 0,008	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,003 ¹	0,05 ± 0,01
СФМ SFM	0,03 ± 0,002 ²³⁴	0,02 ± 0,004 ²³⁴	0,004 ± 0,001 ¹⁴	0,004 ± 0,001 ¹	0,01 ± 0,001 ¹	0,007 ± 0,002 ¹	0,008 ± 0,002 ¹²	0,005 ± 0,001 ¹
Неизвестные Unknown	0,24 ± 0,03 ²³⁴	0,29 ± 0,07 ²³⁴	0,05 ± 0,004 ¹	0,05 ± 0,01 ¹	0,04 ± 0,01 ¹	0,06 ± 0,01 ¹	0,03 ± 0,01 ¹	0,05 ± 0,004 ¹
ТАГ TAG	2,56 ± 0,79 ²³	0,33 ± 0,14	0,5 ± 0,16 ¹³	0,29 ± 0,25	0,05 ± 0,06 ¹²	0	1,86 ± 1,06	0,05 ± 0,02
ЭХС ECHOL	0,49 ± 0,25	0,29 ± 0,1 ²	0,35 ± 0,12 ³	0,08 ± 0,01 ¹	0,04 ± 0,03 ²	0,08 ± 0,07	0,19 ± 0,08	0,36 ± 0,12
ХС CHOL	0,09 ± 0,04 ²³⁴	0,49 ± 0,23 ²³	1,35 ± 0,14 ¹³	1,24 ± 0,25 ¹	0,98 ± 0,12 ¹²	1,38 ± 0,23 ¹	1,01 ± 0,1 ¹	0,65 ± 0,35
ХС/ФЛ CHOL/PL	0,02 ± 0,01 ²³⁴	0,16 ± 0,09	0,41 ± 0,06 ¹	0,43 ± 0,12	0,29 ± 0,05 ¹	0,41 ± 0,11	0,31 ± 0,06 ¹	0,27 ± 0,16
14:0	2,68 ± 0,34 ²³	1,43 ± 0,17 ²	1,47 ± 0,21 ¹⁴	0,96 ± 0,05 ¹	1,17 ± 0,16 ¹⁴	1,08 ± 0,14	2,7 ± 0,49 ²³	2,13 ± 0,76

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Режим содержания Regime of fish keeping	Лагуна Колюшковая Lagoon Kolyushkova (0)		Аквариальный эксперимент Aquarian experiment			(3)	
	(1)		(2)				
16:0	15,02 ± 0,4523	17,63 ± 0,28	17,25 ± 0,261	17,67 ± 0,12	16,93 ± 0,271	19,13 ± 1,99	16,05 ± 0,54
18:0	4,95 ± 0,4923	7,55 ± 0,232	7,82 ± 0,621	9,97 ± 0,3514	8,84 ± 0,511	7,47 ± 1,32	6,67 ± 0,9623
20:0	1,24 ± 0,143	1,18 ± 0,142	1,58 ± 0,1	1,8 ± 0,121	1,82 ± 0,061	2,31 ± 0,58	1,45 ± 0,1
ΣНЖК ΣSFA	25,01 ± 0,7723	29,35 ± 0,42	29,43 ± 0,721	32,2 ± 0,6314	30,06 ± 0,691	33,71 ± 4,09	27,5 ± 1,0223
16:1(n-7)	3,27 ± 0,3623	2,55 ± 0,23	2 ± 0,131	2,04 ± 0,13	1,75 ± 0,081	3,15 ± 0,6	2,53 ± 0,61
18:1(n-9)	13,13 ± 0,72	11,82 ± 0,35	12,01 ± 0,164	12,89 ± 0,51	11,96 ± 0,344	16,29 ± 1,4823	13,86 ± 1,24
18:1(n-7)	3,72 ± 0,2323	3,8 ± 0,183	3,27 ± 0,31	3,23 ± 0,29	2,78 ± 0,061	3,89 ± 0,54	3,23 ± 0,46
20:1(n-9)	5,88 ± 123	2,34 ± 0,38	3,14 ± 0,6514	1,44 ± 0,13	2,77 ± 0,5914	6,95 ± 1,4323	5,18 ± 1,92
22:1(n-11)	3,33 ± 0,733	0,74 ± 0,2	1,03 ± 0,35	0,54 ± 0,06	0,97 ± 0,311	2,6 ± 0,85	2,95 ± 1,32
ΣМНЖК ΣMUFA	32,95 ± 2,523	23,92 ± 0,92	25,19 ± 0,9814	23,71 ± 0,62	23,96 ± 1,1314	37,23 ± 4,0723	31,34 ± 5,81
18:2(n-6)	1,65 ± 0,13	1,37 ± 0,113	1,45 ± 0,12	1,13 ± 0,1	1,33 ± 0,111	1,27 ± 0,22	1,38 ± 0,2
20:4(n-6)	2,14 ± 0,3823	2,89 ± 0,452	3,3 ± 0,371	4,42 ± 0,171	4,04 ± 0,341	2,12 ± 0,92	3,09 ± 0,88
Σ (n-6) ПНЖК Σ (n-6) PUFA	4,39 ± 0,3223	5,29 ± 0,312	5,47 ± 0,261	6,35 ± 0,211	6,13 ± 0,311	4,27 ± 0,92	5,33 ± 0,79
18:3(n-3)	0,37 ± 0,03234	0,25 ± 0,0323	0,2 ± 0,041	0,15 ± 0,021	0,23 ± 0,051	0,22 ± 0,081	0,26 ± 0,05
18:4(n-3)	0,57 ± 0,1 ²³	0,16 ± 0,04	0,25 ± 0,07 ¹	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,02 ¹	0,28 ± 0,15	0,32 ± 0,1
20:5(n-3)	7,67 ± 0,78 ²³	11,16 ± 0,55	10,63 ± 0,39 ¹⁴	11,74 ± 0,42	11,52 ± 0,45 ¹	5,17 ± 1,83 ²	8,63 ± 1,6
22:5(n-3)	4,01 ± 0,14 ²³⁴	3,64 ± 0,12 ²	3,27 ± 0,22 ¹	3,04 ± 0,17 ¹	3,19 ± 0,19 ¹⁴	2,11 ± 0,51 ¹³	3,38 ± 0,32
22:6(n-3)	22,32 ± 1,08 ⁴	24,18 ± 1,07 ²	22,96 ± 0,58 ⁴	20,11 ± 1,14 ¹	21,79 ± 0,62 ⁴	11,52 ± 3,55 ¹²³	20,6 ± 3,26
Σ (n-3) ПНЖК Σ (n-3) PUFA	35,85 ± 1,53 ⁴	40,05 ± 1,22 ²	38,27 ± 0,67 ⁴	36,02 ± 0,94 ¹	37,97 ± 0,82 ⁴	20,97 ± 5,52 ¹²³	34,32 ± 4,86
ΣПНЖК ΣPUFA	41,97 ± 1,8 ⁴	46,67 ± 1,13	45,26 ± 0,81 ⁴	43,97 ± 0,71	45,83 ± 0,91 ⁴	29 ± 5,37 ¹²³	41,14 ± 5,36
(n-3)/(n-6)	8,29 ± 0,32 ²³⁴	7,78 ± 0,57 ²	7,06 ± 0,33 ¹⁴	5,7 ± 0,33 ¹	6,32 ± 0,38 ¹⁴	4,51 ± 0,68 ¹²³	6,48 ± 0,5
16:0/18:1(n-9)	1,17 ± 0,09 ²³	1,5 ± 0,06	1,44 ± 0,02 ¹	1,38 ± 0,06	1,42 ± 0,04 ¹	1,22 ± 0,15	1,19 ± 0,12

Примечание. ОЛ – общие липиды, ФЛ – общие фосфолипиды, ФИ – фосфатидилинозитол, ФС – фосфатидилсерин, ФЭА – фосфатидилэтаноллин, ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СФМ – сфингомиелин, ТАГ – триацилглицерины, ЭХС – эфиры холестерина, ХС – холестерин, НЖК – насыщенные жирные кислоты, МНЖК – мононасыщенные жирные кислоты, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты. Значения представлены в виде: М ± m. Надстрочные цифры над средним значением липидного показателя показывают достоверность отличий (p ≤ 0,05): ¹ – значение достоверно отличается от такового у колюшки из лагуны Колюшковая, ² – 7 дн. голодания, ³ – 1 ч. питания, ⁴ – 24 ч. питания. Парные сравнения проводили только в рамках группы самцов и самок.

Note. TL – total lipids, PL – total phospholipids, PI – phosphatidylinositol, PS – phosphatidylserine, PEА – phosphatidylethanolamine, PC – phosphatidylcholine, LPC – lysophosphatidylcholine, SFM – sphingomyelin, TAG – triacylglycerols, ECHOL – cholesterol esters, CHOL – saturated fatty acids, MUFA – monounsaturated fatty acids, PUFA – polyunsaturated fatty acids. The values are given in the form: M ± m. Supernumerary figures over the average value of the lipid index show the reliability of the differences (p ≤ 0,05): ¹ – the value significantly differs from that of the stickleback from the lagoon Kolyushkova, ² – 7 days of fasting, ³ – 1 hour of nutrition, ⁴ – 24 hours of nutrition. The pairwise comparisons were conducted only within the framework of a group of males and females.

Схожая вариация уровня НЖК за счет 14:0, 16:0, 18:0, 20:0 также показана в мышцах самцов – увеличение его при голодании и при возобновлении питания (8-е сут.) по сравнению с уровнем у контрольной группы и при возобновлении кормления (9-е сут.).

Коэффициент интенсивности метаболизма 16:0/18:1(n-9) увеличивался у рыб при голодании и при возобновлении питания (8-е сут.) – 1,44 и 1,42 – по сравнению с таковым у рыб из контрольной группы и при возобновлении питания (9-е сут.), у которых он не различался – 1,17 и 1,22.

Мышцы, самки

В мышцах самок уровень ОЛ варьирует в значительно меньшей степени, чем у самцов, и достоверно снижается только у особей при возобновлении питания (9-е сут.) по сравнению с таковым у контрольной группы (3,87 и 5,46 % сухого вещества). Соответствующее снижение количества показано для ТАГ, при этом их уровень слабодетектируем (следовые количества) в мышцах самок в аквариальном эксперименте при возобновлении кормления (8-е сут.), а также общих ФЛ за счет ФЭА, ФС и СФМ (табл. 3). В том числе исчерпываются запасы ЭХС у рыб при голодании по сравнению с контрольной группой, но их уровень восстанавливается при возобновлении питания (9-е сут.). Уровень ХС увеличивается при голодании по сравнению с контрольной группой (1,24 vs 0,49 % сухого вещества) и снижается в мышцах самок при возобновлении питания (9-е сут.), достоверно не различаясь с таковым контрольной группы (0,65 и 0,49 % сухого вещества). При этом направление варьирования значений коэффициента ХС/ФЛ у исследуемых особей соответствует динамике уровня ХС.

Уровень доминирующих ПНЖК в мышцах самок в контрольной группе и в ходе аквариального эксперимента не различался и был в пределах от 41,14 до 46,67 % суммы ЖК. Количество ЖК семейств (n-3) и (n-6) за счет ДГК, ДПК и АРА разнонаправленно изменяется – снижается и повышается соответственно – в мышцах самок при голодании по сравнению с таковым контрольной группы (табл. 2). Коэффициент (n-3)/(n-6) в мышцах самок оставался относительно стабильным и достоверно снижался только у рыб при голодании по сравнению с контролем (табл. 2). Количество МНЖК у исследуемых рыб достоверно повысилось при возобновлении кормления (9-е сут.). При этом установлено единственное достоверное снижение уровня 16:1(n-7) и 18:1(n-7) в мышцах

самок при возобновлении питания (8-е сут.) по сравнению с контрольной группой. Наибольшие достоверные вариации показаны для НЖК, за счет 18:0, уровень которых незначительно увеличивался у особей при голодании и при возобновлении питания на 8-е сут. по сравнению с контрольной группой, а затем снижался до количества контрольных особей.

Коэффициент интенсивности метаболизма 16:0/18:1(n-9) в мышцах исследованных рыб достоверно не различался.

Обсуждение

Мышцы трехиглой колюшки накапливают липиды в большей степени для собственных нужд и поддержания своих функциональных возможностей, связанных с активным движением, перемещениями (миграциями) на длительные дистанции, противостоянием потоку и многим другим. При этом качественный и количественный состав липидов мышц демонстрирует высокую ценность рассматриваемой рыбы как промежуточного звена в перемещении вещества и энергии в форме этих многообразных биохимических веществ, в том числе физиологически значимых ЖК, к консументам более высоких порядков, которыми в том числе являются коммерчески значимые виды рыб (навага, сельдь, треска и другие). Для лососевых рыб, например, показана более четкая и широкая динамика количества липидов в мышцах, чем в печени, ввиду того, что мышцы выполняют роль энергетического депо [Лизенко и др., 1980].

В настоящем исследовании мышцы самцов колюшки в летний сезон в природных условиях характеризовались большим количеством ОЛ, чем мышцы самок, что, возможно, связано с участием липидов мышц в процессах нереста у самок, о чем может также свидетельствовать более низкий уровень энергетических ТАГ, в том числе МНЖК, которые являются структурными компонентами этой группы липидов. Таким образом, показаны достоверные различия по уровню ОЛ, ФЛ и ТАГ в мышцах самок и самцов, что подтверждается данными дисперсионного анализа. Содержание ОЛ, ФЛ и ХС в мышцах колюшки достоверно различается при разных режимах кормления. При этом различий в уровне ЭХС в мышцах исследованных рыб по полу или на разных этапах эксперимента не установлено, что указывает на сравнительно низкую степень вовлеченности и значимости этой группы запасных липидов (минорных по количеству) в мышцах колюшки при данных условиях.

Результаты, свидетельствующие о том, что упитанность самок меньше упитанности самцов колюшки, согласуются с данными ранее опубликованных работ [Демчук и др., 2018]. Упитанность самцов и самок колюшки, обусловленная изменениями липидного спектра мышц, также может быть отражением уровня гиперфагии, которая, как показано в исследованиях на лососевых [Jobling et al., 1993], а также колюшковых [Zhu et al., 2003], наблюдается при долговременном ограничении или дисбалансе питания, сопровождающемся критическим снижением жировых запасов [Won, Borski, 2013].

Качественный состав липидов и ЖК у обоих полов контрольной группы был сходен. Некоторые различия в количественном содержании связаны с более высоким уровнем ПНЖК (включая кислоты семейств (n-3) и (n-6)), коэффициента (n-3)/(n-6), количества НЖК, а также с более низким количеством общих ФЛ и МНЖК у самок. Таким образом, для самок и самцов колюшки, обитающих в природных условиях в период завершения нереста, показано отсутствие половых различий в качественном составе липидов, но обнаружена количественная дифференциация липидного спектра.

Ранее [Мурзина и др., 2018] была показана тканевая неоднородность и специфичность липидного и ЖК-спектра в мышцах, печени и гонадах трехиглой колюшки Белого моря, обитающей в прибрежной зоне в нерестовый период. Был установлен высокий уровень ПНЖК в мышцах и гонадах самок в преднерестовый период, в основном семейства (n-3), в которых доминировали эссенциальные ЭПК и ДГК. При этом показано, что основным органом депонирования липидов у колюшки является печень, ее функциональная роль, по-видимому, значительно шире, чем у мышц, и она участвует в поддержании энергетического и пластического обмена, в синтезе веществ стероидной природы для обеспечения надлежащего функционирования всех органов и систем. Так, в наших исследованиях показано [Мурзина и др., 2019], что качественный и количественный состав липидов и некоторых ЖК в печени и гонадах отражает взаимосвязь этих органов в преднерестовый и нерестовый периоды, в том числе в формировании «метаболически» активной икры в зависимости от трофических условий нерестилищ.

Наиболее существенные различия и избирательность использования липидов продемонстрированы между самками и самцами рыб в процессе аквариального эксперимента, включающего их голодание и разные режимы питания. Прежде всего следует отметить более

драматическое снижение количества ОЛ при голодании у самцов, однако после возобновления питания их уровень достоверно не различается с таковым у рыб из контрольной группы. При этом в мышцах самок количество ОЛ при голодании не изменялось, и их уровень в этой ткани у самок достоверно снижается по сравнению с контрольной группой только при возобновлении питания (9-е сутки). Эти результаты согласуются с синхронным изменением упитанности рыб.

Полученные данные могут свидетельствовать о способности метаболических систем мышц самцов колюшки к быстрому восстановлению и накоплению необходимого уровня липидов после прекращения голодания. Относительно постоянный уровень ОЛ в мышцах самок при голодании может объясняться его поддержанием за счет первоочередного использования энергетических липидов – ТАГ – до их полной утилизации при голодании, а также отдельных ФЛ за счет ключевых структурных ФЭА и ФХ. Особая значимость в поддержании жизнедеятельности организма обоих полов в условиях голодания была показана для ТАГ (основной молекулярной формы депонирования энергии), что вполне можно рассматривать как единый механизм развития ответной реакции на условия голодания и ограниченности пищи у рыб [Лизенко и др., 1980; Sargent et al., 1999; Godavarthy et al., 2012]. Высокая лабильность установлена для ФЛ, при этом использование индивидуальных липидных классов в механизмах компенсаторных реакций, направленных на поддержание гомеостаза в условиях голодания, различалось для самок и самцов. В мышцах самцов снижается также и общий уровень ФЛ, структурных липидов. Известно, что их использование у рыб происходит в том случае, когда исчерпаны запасы энергетических липидов или их уровень критически снижен, в этих условиях ФЛ также начинают включаться в процессы энергетического обмена. Компенсаторный характер снижения количества ФЛ достигается за счет включения сложных биохимических механизмов, позволяющих, с одной стороны, их катаболизировать, а с другой – обеспечивать избирательность их трансформации. Так, в мышцах самцов в ходе аквариального эксперимента наблюдается альтерация ФХ, ФЭА, ЛФХ, возможно, благодаря этому достигается баланс между выполнением структурной и энергетической функции данных ФЛ. За счет этого механизма, а также за счет увеличения уровня другого представителя структурных липидов – ХС – в мышцах обеспечивается поддержание надлежащих фи-

зико-химических свойств липидного окружения биомембран, что обеспечивает необходимую работу мембраносвязанных ферментов и их комплексов [Arts et al., 2009], в том числе ферментов энергетического обмена. Изменением уровня ХС и соотношения ХС/ФЛ достигается вязкость мембраны, оптимальная для поступления необходимых компонентов для обеспечения функционирования всех систем клеточного метаболизма в условиях голодания и при возобновлении питания.

Следует отметить, что резких изменений уровня ФИ и ФС, которые принимают участие в передаче клеточных сигналов [Крепс, 1981], в том числе при стрессовом воздействии, не установлено. Однако для ФС показано незначительное, но достоверное его снижение у самцов рыб в ходе аквариального эксперимента по сравнению с контрольной группой, а для ФИ – уменьшение его содержания в мышцах самок при возобновлении кормления (9-е сут.) по сравнению с контрольной группой. ФИ является одним из источников образующихся с участием фосфолипаз С-диглицеридов, которые выполняют роль сигнальных молекул [Ипатова, 2005]. Кроме того, известно, что ФИ является предшественником фосфоинозитов, которые образуются под действием гормонов и ряда других эффекторов [Berrigge, 1987].

Увеличение уровня ХС в мышцах самцов и самок в условиях голодания и при возобновлении питания было установлено и для других видов рыб, при этом степень его вариации различается у разных видов [Лизенко и др., 1980; Godavarthy et al., 2012]. Считается, что за счет изменения его уровня у рыб при голодании, наряду с энергетическими липидами, достигается удовлетворение необходимых потребностей организма в энергии, поскольку используется для синтеза глюкозы. Кроме того, ХС используется для синтеза желчных кислот в организме, при голодании эти процессы сдерживаются. В одной из работ [Godavarthy et al., 2012] предполагается, что в условиях голодания ХС выступает предшественником гормонов стресса, которые могут либо способствовать усилению глюконеогенеза, либо повышать сопротивляемость организма. При долговременном голодании (60 дн.) у анабаса (*Anabas testudineus*) также продемонстрировано увеличение содержания ХС [Godavarthy et al., 2012]. Ранее нами было показано накопление ХС в печени пятнистого лептокллина (*Leptoclinus maculatus*), что рассматривалось как защитный механизм, снижающий окисляемость мембранных липидов в специфических условиях [Мурзина, 2010; Murzina et al., 2012].

В описанных выше экспериментах коэффициент интенсивности метаболизма (определяемый соотношением 16:0/18:1(n-9)) [Arts et al., 2009] в мышцах самок колюшки достоверно не изменялся, что может косвенно свидетельствовать о физиолого-биохимической устойчивости этой ткани и преадаптации организма к изменению питания. У самцов при голодании и при возобновлении кормления (8-е сут.) этот коэффициент повышался, что подтверждает высказанное выше предположение о том, что для поддержания гомеостаза при изменении условий питания у самцов необходимо участие определенных компенсаторных механизмов, включающих изменения качественного и количественного состава липидов и их ЖК.

Особо интересным при анализе роли ЖК в поддержании гомеостаза колюшки в условиях голодания является то, что в мышцах самцов при голодании достоверно не изменяется (по сравнению с контрольной группой) уровень ПНЖК, в том числе семейства (n-3) и отдельных ЖК – ДГК. Однако при возобновлении питания (на 9-е сут.) эти показатели существенно снижались. В аналогичных условиях (при голодании и возобновлении питания) в мышцах самок сумма ПНЖК также не различалась. Незначительные вариации показаны только для ДГК в мышцах самок при голодании по сравнению с таковым контрольной группы.

Несмотря на то что обычно уровень ПНЖК достаточно стабилен при воздействии тех или иных факторов и изменяется только в критических ситуациях [Крепс, 1981], в наших исследованиях обнаружена специфичность расхода отдельных физиологически значимых кислот этого класса – ДГК у самцов и ЭПК у самок, что, скорее всего, связано с их особой физиологической ролью, которую они выполняют в организме рыб [Sargent et al., 1999; Tocher, 2003; Arts et al., 2009]. Например, ДГК селективно удерживается во фракции ФЛ при длительном голодании у золотоголового морского леща [Koven et al., 1989] и палтуса [Rainuzzo et al., 1994].

При соотношении полученных результатов по динамике отдельных липидов и ЖК в мышцах у самок и самцов колюшки в природных условиях, при голодании и при возобновлении питания в аквариальных условиях с данными по упитанности рыб можно заключить, что при возобновлении питания самки и самцы поглощают пищу более активно, на это указывает восстановление уровня ТАГ и некоторых пищевых ЖК у самок, а также повышение уровня ОЛ и в том числе пищевых кислот – 16:1(n-7), 18:1(n-9), 18:1(n-7) и 20:1(n-9) у самцов.

Установленные временные изменения для различных липидов и ЖК при голодании и исследованных режимах возобновления питания различаются и отражают физиолого-биохимический статус организма, который определяется в том числе активностью ферментов липидного и энергетического обмена, а также функциональной ролью и значимостью отдельных групп липидов в организме.

Авторы выражают благодарность УНБ «Беломорская» СПбГУ за возможность сбора и обработки материала на Белом море.

Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0221-2017-0050) и при финансовой поддержке РФФИ, проект № 17-34-50158 мол_нр.

Литература

- Демчук А. С., Иванов М. В., Иванова Т. С., Полякова Н. В., Головин П. В., Лайус Д. Л. Питание беломорской трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* (Linnaeus, 1758) на нерестилищах // Труды КарНЦ РАН. 2018. № 4. С. 42–58. doi: 10.17076/them818
- Ипатов О. М. Фосфолипиды: механизм действия и применения в клинике. М.: Изд. ГУ НИИ БМХ РАМН, 2005. 318 с.
- Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. Л.: Наука, 1981. 339 с.
- Лайус Д. Л., Иванова Т. С., Шатских Е. В., Иванов М. В. «Волны жизни» беломорской колюшки // Природа. 2013. № 4. С. 43–52.
- Лизенко Е. И., Чеченков А. В., Полина А. В. Содержание липидов в некоторых органах заводской молоди атлантического лосося в зависимости от возраста, сезона и условий выращивания // Биохимия пресноводных рыб Карелии. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1980. С. 21–29.
- Мурзина С. А. Роль липидов и их жирнокислотных компонентов в биохимических адаптациях люмпена пятнистого *Leptoclinus maculatus* северо-западного побережья о. Шпицберген: Дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2010. 184 с.
- Мурзина С. А., Нефедова З. А., Пеккоева С. Н., Воронин В. П., Лайус Д. Л., Иванова Т. С., Немова Н. Н. Липидный и жирнокислотный статус печени и гонад трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* (сем. Колюшковые, Gasterosteidae) с разных нерестилищ в Белом море // Известия РАН. Сер. биол. 2018. № 6. С. 593–602.
- Мурзина С. А., Нефедова З. А., Пеккоева С. Н., Лайус Д. Л., Немова Н. Н. Жирные кислоты колюшки трехиглой *Gasterosteus aculeatus* Белого моря // Прикладная биохимия и микробиология. 2019 (в печати).
- Сидоров В. С., Лизенко Е. И., Болгова О. М., Нефедова З. А. Липиды рыб. 1. Методы анализа. Текущая специфичность ряпушки *Coregonus albula* L. // Лососевые (Salmonidae) Карелии. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1972. № 1. С. 152–163.
- Цыганов Э. П. Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагеля // Лаб. дело. 1971. № 8. С. 490–493.
- 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 // J. Lipid Res. 1996. Vol. 3. P. 684–689.
- Arts M. T., Brett M. T., Kainz M. J. Lipids in Aquatic Ecosystems. Dordrecht: Springer, 2009. 377 p. doi: 10.1007/s11745-009-3335-1
- Bakhvalova A. E., Ivanova T. S., Ivanov M. V., Demchuk A. S., Movchan E. A., Lajus D. L. Long-term changes in the role of threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* in the White Sea: predatory fish consumption reflects fluctuating stickleback abundance during the last century // Evol. Ecol. Res. 2016. Vol. 17. P. 317–334.
- Berridge M. J. Inositol lipids and cell proliferation // Biochem. Biophys. Acta. 1987. Vol. 907. P. 33–45.
- Cury P., Bakun A., Crawford R. J. M., Jarre A., Quinones R. A., Shannon L. J., Verheye H. M. Small pelagics in upwelling systems: patterns of interaction and structural changes in “wasp-waist” ecosystems // ICES J. Mar. Sci. 2000. Vol. 57. P. 603–618. doi: 10.1006/jmsc.2000.0712
- Engelbrecht F. M., Mari F., Anderson J. T. Cholesterol determination in serum. A rapid direction method // S. Afr. Med. J. 1974. Vol. 48. P. 250–356.
- Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497–509.
- Godavarthy P., Kumari Y. S., Bikshapathy E. Starvation induced cholesterologenesis in hepatic and extra hepatic tissues of climbing perch, *Anabas testudineus* (Bloch) // Saudi J. Biol. Sci. 2012. Vol. 19. P. 489–494. doi: 10.1016/j.sjbs.2012.07.004
- Ivanova T. S., Ivanov M. V., Golovin P. V., Polyakova N. V., Lajus D. L. The White Sea threespine stickleback population: spawning habitats, mortality and abundance // Evol. Ecol. Res. 2016. Vol. 17. P. 301–315.
- Jeziarska B., Hazel J. R., Gerking S. D. Lipid mobilization during starvation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with attention to fatty acid // J. Fish Biol. 1982. Vol. 21. P. 681–692.
- Jobling M., Baardvik B. M., Christiansen J. S., Jørgensen E. H. The effects of prolonged exercise training on growth performance and production parameters in fish // Aquacult. Int. 1993. Vol. 1, no. 2. P. 95–111.
- Koven W. M., Kissil G. W., Tandler A. Lipid and n-3 requirements of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding // Aquaculture. 1989. Vol. 79. P. 185–191.
- Møller P. Lipids and stable isotopes in marine food webs in West Greenland. Trophic relations and health implications // PhD thesis, National Environmental Research Institute, Denmark. 2006. 212 p. URL: http://www2.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_Ovrige/rapporter/phd_PEM.pdf (дата обращения: 20.09.2018).

Murzina S. A., Meyer Ottesen C. A., Falk-Petersen S., Hop H., Nemova N. N., Polyektova O. G. Oogenesis and lipids in gonad and liver of daubed shanny (*Leptoclinus maculatus*) females from Svalbard waters // *Fish Physiol. Biochem.* 2012. Vol. 38, no. 5. P. 1393–1407. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-012-9627-z> (дата обращения: 20.09.2018).

Osako K., Kuwahara K., Saito H., Hossain M. A., Nozaki Y. Effect of starvation on lipid metabolism and stability of DHA content of lipids in horse mackerel (*Trachurus japonicus*) tissues // *Lipids.* 2003. Vol. 38. P. 1263–1267.

Rainuzzo J. R., Reitan K. I., Jorgensen L., Olsen Y. Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsion of different lipid classes // *Comp. Biochem. Physiol.* 1994. Vol. 107A, no. 4. P. 699–710.

Sargent J., Bell G., McEvoy L., Tocher D., Estevez A. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish // *Aquaculture.* 1999. Vol. 177. P. 191–199.

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.

Walsh D. E., Banasik O. J., Gilles K. A. Thin-layer chromatographic separation and colorimetric analysis of barley or malt lipid classes and their fatty acids // *J. Chromatogr.* 1965. Vol. 17. P. 278–287.

Won E., Borski R. Endocrine Regulation of Compensatory Growth in Fish // *Frontiers in Endocrinology.* 2013. Vol. 4, no. 74. P. 1–13.

Zhu X., Wu L., Cui Y., Yang, Y., Wootton R. J. Compensatory growth response in three-spined stickleback in relation to feed deprivation protocols // *J. Fish Biol.* 2003. Vol. 62. P. 195–205.

Поступила в редакцию 28.09.2018

References

Demchuk A. S., Ivanov M. V., Ivanova T. S., Polyakova N. V., Golovin P. V., Laius D. L. Pitanie belomorskoj trekhigloi kolyushki *Gasterosteus aculeatus* (Linnaeus, 1758) na nerestilishchakh [Nutrition of the stickleback *Gasterosteus aculeatus* from the White Sea (Linnaeus, 1758) in the spawning grounds]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2018. No. 4. P. 42–58.

Ipatova O. M. Fosfogliv: mekhanizm deistviya i primeneniya v klinike [Phosphogliv: mechanism of action and application in the clinic]. Moscow: GU NII BMKH RAMN, 2005. 318 p.

Kreps E. M. Lipidy kletochnykh membran. Evolyutsiya lipidov mozga. Adaptatsionnaya funktsiya lipidov [Lipids of cell membranes. Evolution of brain lipids. Adaptive function of lipids]. St. Petersburg: Nauka, 1981. 339 p.

Laius D. L., Ivanova T. S., Shatskikh E. V., Ivanov M. V. "Volny zhizni" belomorskoj kolyushki ["Waves of life" of the White Sea stickleback]. *Priroda* [Nature]. 2013. No. 4. P. 43–52.

Lizenko E. I., Chechenkov A. V., Polina A. V. Soderzhanie lipidov v nekotorykh organakh zavodskoi molodi atlanticheskogo lososya v zavisimosti ot vozrasta, sezona i uslovii vyrashchivaniya [The content of lipids in some organs of the factory juvenile Atlantic salmon, depending on the age, season, and growing conditions]. *Biokhimiya presnovodnykh ryb Karelii* [Biochemistry of freshwater fish of Karelia]. Petrozavodsk: Karel. fil. AN SSSR, 1980. P. 21–29.

Murzina S. A., Nefedova Z. A., Pekkoeva S. N., Laius D. L., Nemova N. N. Zhirnye kisloty kolyushki trekhigloi *Gasterosteus aculeatus* Belogo morya [Fatty acids of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* in the White Sea]. *Appl. Biochem. and Microbiol.* 2019 (in press).

Murzina S. A., Nefedova Z. A., Pekkoeva S. N., Voronin V. P., Laius D. L., Ivanova T. S., Nemova N. N. Lipidnyi i zhirnokislotsnyi status pecheni i gonad trekhigloi kolyushki *Gasterosteus aculeatus* (sem. Kolyushkovye, Gasterosteidae) s raznykh nerestilishch v Belom more [Lipid and fatty acid status of the liver and gonads

of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (the family of Kolushkovye, Gasterosteidae) from different spawning grounds in the White Sea]. *Izvestiya RAN* [Proceed. RAS]. 2018. No. 6. P. 593–602.

Murzina S. A. Rol' lipidov i ikh zhirnokislotsnykh komponentov v biokhimicheskikh adaptatsiyakh lyumpena pyatnistogo *Leptoclinus maculatus* severo-zapadnogo poberezh'ya o. Shpitsbergen [The role of lipids and their fatty acid components in biochemical adaptations of the daubed shanny *Leptoclinus maculatus* on the northwestern coast of Svalbard]: Summary of PhD (Cand. of Biol.) thesis. Petrozavodsk, 2010. 184 p.

Sidorov V. S., Lizenko E. I., Bolgova O. M., Nefedova Z. A. Lipidy ryb. 1. Metody analiza. Tkanevaya spetsifichnost' ryapushki *Coregonus albula* L. [Fish lipids. 1. Methods of analysis. Tissue specificity of the vendace *Coregonus albula* L.]. *Lososevye (Salmonidae) Karelii* [Salmonidae of Karelia]. Petrozavodsk: Karel. fil. AN SSSR, 1972. Iss. 1. P. 152–163.

Tsyganov E. P. Metod pryamogo metilirovaniya lipidov posle TSKh bez elyuirovaniya s silikagelem [The method of direct methylation of lipids after TLC without elution from silica gel]. *Laboratornoe delo* [Laboratory work]. 1971. No. 8. P. 490–493.

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. *J. Lipid Res.* 1996. Vol. 3. P. 684–689. doi: 10.17076/them818

Arts M. T., Brett M. T., Kainz M. J. Lipids in Aquatic Ecosystems. Dordrecht: Springer, 2009. 377 p. doi: 10.1007/s11745-009-3335-1

Bakhvalova A. E., Ivanova T. S., Ivanov M. V., Demchuk A. S., Movchan E. A., Laius D. L. Long-term changes in the role of threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* in the White Sea: predatory fish consumption reflects fluctuating stickleback abundance during the last century. *Evol. Ecol. Res.* 2016. Vol. 17. P. 317–334.

Berridge M. J. Inositol lipids and cell proliferation. *Biochem. Biophys. Acta*. 1987. Vol. 907. P. 33–45.

Cury P., Bakun A., Crawford R. J. M., Jarre A., Quinones R. A., Shannon L. J., Verheye H. M. Small pelagics in upwelling systems: patterns of interaction and structural changes in “wasp-waist” ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*. 2000. Vol. 57. P. 603–618. doi: 10.1006/jmsc.2000.0712

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

Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957. Vol. 226. P. 497–509.

Godavarthy P., Kumari Y. S., Bikshapathy E. Starvation induced cholesterologenesis in hepatic and extra hepatic tissues of climbing perch, *Anabas testudineus* (Bloch). *Saudi J. Biol. Sci.* 2012. Vol. 19. P. 489–494. doi: 10.1016/j.sjbs.2012.07.004

Ivanova T. S., Ivanov M. V., Golovin P. V., Polyakova N. V., Lajus D. L. The White Sea threespine stickleback population: spawning habitats, mortality and abundance. *Evol. Ecol. Res.* 2016. Vol. 17. P. 301–315.

Jeziarska B., Hazel J. R., Gerking S. D. Lipid mobilization during starvation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with attention to fatty acid. *J. Fish Biol.* 1982. Vol. 21. P. 681–692.

Jøbling M., Baardvik B. M., Christiansen J. S., Jørgensen E. H. The effects of prolonged exercise training on growth performance and production parameters in fish. *Aquacult. Int.* 1993. Vol. 1, no. 2. P. 95–111.

Koven W. M., Kissil G. W., Tandler A. Lipid and n-3 requirements of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding. *Aquaculture*. 1989. Vol. 79. P. 185–191.

Møller P. Lipids and stable isotopes in marine food webs in West Greenland. Trophic relations and health implications: PhD thesis, National Environmen-

tal Research Institute, Denmark. 2006. 212 p. URL: http://www2.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_Ovrige/rapporter/phd_PEM.pdf (accessed: 20.09.2018).

Murzina S. A., Meyer Ottesen C. A., Falk-Petersen S., Hop H., Nemova N. N., Polyektova O. G. Oogenesis and lipids in gonad and liver of daubed shanny (*Leptoclinius maculatus*) females from Svalbard waters. *Fish Physiol. Biochem.* 2012. Vol. 38, no. 5. P. 1393–1407. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-012-9627-z> (accessed: 20.09.2018).

Osako K., Kuwahara K., Saito H., Hossain M. A., Nozaki Y. Effect of starvation on lipid metabolism and stability of DHA content of lipids in horse mackerel (*Trachurus japonicus*) tissues. *Lipids*. 2003. Vol. 38. P. 1263–1267.

Rainuzzo J. R., Reitan K. I., Jørgensen L., Olsen Y. Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsion of different lipid classes. *Comp. Biochem. Physiol.* 1994. Vol. 107A, no. 4. P. 699–710.

Sargent J., Bell G., McEvoy L., Tocher D., Estevez A. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*. 1999. Vol. 177. P. 191–199.

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.

Walsh D. E., Banasik O. J., Gilles K. A. Thin-layer chromatographic separation and colorimetric analysis of barley or malt lipid classes and their fatty acids. *J. Chromatogr.* 1965. Vol. 17. P. 278–287.

Won E., Borski R. Endocrine Regulation of Compensatory Growth in Fish. *Frontiers in Endocrinology*. 2013. Vol. 4, no. 74. P. 1–13.

Zhu X., Wu L., Cui Y., Yang Y., Wootton R. J. Compensatory growth response in three-spined stickleback in relation to feed deprivation protocols. *J. Fish Biol.* 2003. Vol. 62. P. 195–205.

Received September 28, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Бакхвалова Анастасия Евгеньевна

стажер-исследователь каф. ихтиологии и гидробиологии Санкт-Петербургский государственный университет 16-я линия В. О., 29, Санкт-Петербург, Россия, 199034 эл. почта: nastyabakhvalova94@gmail.com тел.: (812) 3213279

Мурзина Светлана Александровна

заведующая лаб. экологической биохимии, к. б. н. Институт биологии КарНЦ РАН, Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр РАН» ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910 эл. почта: murzina.svetlana@gmail.com тел.: (8142) 783615

Воронин Виктор Петрович

стажер-исследователь лаборатории экологической биохимии Институт биологии КарНЦ РАН, Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр РАН» ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910 эл. почта: voronen-viktor@mail.ru тел.: (8142) 783615

CONTRIBUTORS:

Bakhvalova, Anastasia

St. Petersburg State University 29 16th Line Vasilevsky Island, 199034 St. Petersburg, Russia tel.: (812) 3213279 e-mail: nastyabakhvalova94@gmail.com

Murzina, Svetlana

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia e-mail: murzina.svetlana@gmail.com tel.: (8142) 783615

Voronin, Viktor

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

Пеккоева Светлана Николаевна

и. о. научного сотрудника лаб. экологической биохимии
Институт биологии КарНЦ РАН, Федеральный
исследовательский центр «Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: pek-svetlana@mail.ru
тел.: (8142) 783615

Руоколайнен Татьяна Рудольфовна

старший научный сотрудник лаб. экологической биохимии,
к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН, Федеральный
исследовательский центр «Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: truok@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 783615

Лайус Дмитрий Людвигович

доцент кафедры ихтиологии и гидробиологии, к. б. н.
Санкт-Петербургский государственный университет
16-я линия В. О., 29, Санкт-Петербург, Россия, 199034
эл. почта: dlajus@gmail.com
тел.: +79217910368, (812) 3213279

Иванова Татьяна Сослановна

научный сотрудник кафедры ихтиологии и гидробиологии
Санкт-Петербургский государственный университет
16-я линия В. О., 29, Санкт-Петербург, Россия, 199034
эл. почта: tut2000@gmail.com
тел.: +79312911042, (812) 3213279

Немова Нина Николаевна

главный научный сотрудник, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
Институт биологии КарНЦ РАН, Федеральный
исследовательский центр «Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 783615

Pekkoeva, Svetlana

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

Ruokolainen, Tatyana

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) 783615

Lajus, Dmitry

St. Petersburg State University
29 16th Line Vasilevsky Island, 199034 St. Petersburg, Russia
e-mail: dlajus@gmail.com
tel.: +79217910368, (812) 3213279

Ivanova, Tatyana

St. Petersburg State University
29 16th Line Vasilevsky Island, 199034 St. Petersburg, Russia
e-mail: tut2000@gmail.com
tel.: +79312911042, (812) 3213279

Nemova, Nina

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

УДК 581.143.32:577.152.1

ОКИСЛЕНИЕ КВЕРЦЕТИНА ПЕРОКСИДАЗОЙ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ

**К. М. Никерова, Н. А. Галибина, Ю. Л. Мощенская,
Л. Л. Новицкая, М. Н. Бородина, И. Н. Софронова**

Институт леса КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

Приведены результаты изучения пероксидазного окисления кверцетина в ксилеме двух форм 40-летних деревьев березы повислой – *Betula pendula* Roth var. *pendula* (обычная береза) и *B. pendula* var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti (карельская береза), различающихся по текстуре древесины, в диапазоне pH от 4 до 10. Кверцетин использован в качестве известного модельного субстрата для изучения пероксидазных процессов. Определены максимумы поглощения кверцетина для изучаемого диапазона pH. Рассмотрены особенности протекания реакции в кислой, нейтральной и щелочной средах для изучаемых объектов. Приведены зависимости активности пероксидазы (ПОД) от времени, а также исследован характер изменения пероксидазной активности в диапазоне pH. Выявлены количественные характеристики реакции окисления кверцетина пероксидазой в ксилеме двух форм березы повислой. Показана более высокая активность кислых изоформ фермента по сравнению с основными у обеих форм березы. В кислой среде активность пероксидазы у обычной березы и карельской березы не отличалась. В щелочной среде активность пероксидазы была значительно выше в ксилеме у карельской березы. Полученные данные свидетельствуют о более высокой окислительной способности пероксидазы в ксилеме карельской березы за счет более активного участия всех изоформ в процессах окисления кверцетина. Высказано предположение, что растительные ткани с нестандартной ферментативной активностью могут быть источниками биологически активных веществ и использоваться в процессах биокатализа.

Ключевые слова: *Betula pendula* Roth var. *pendula*; *Betula pendula* var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti; пероксидаза; кверцетин; pH.

**K. M. Nikerova, N. A. Galibina, Yu. L. Moshchenskaya, L. L. Novitskaya,
M. N. Borodina, I. N. Sofronova. QUERCETIN OXIDATION BY KARELIAN
BIRCH PEROXIDASE**

The article presents the results of a study of peroxidase oxidation of quercetin in the xylem of 40-year-old birch trees of 2 forms differing in wood texture – silver birch (*Betula pendula* Roth var. *pendula*) and Karelian birch (*B. pendula* var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti), in the pH range of 4 to 10. Quercetin was used as a known model substrate for the study of peroxidase processes. The quercetin absorption maxima for the studied pH range were determined. The specific features of the reaction in acidic, neutral and alkaline media were considered for the studied objects. The time dependence of peroxidase activity is presented, as well as the pattern of peroxidase activity change in the pH range. Quercetin oxidation by peroxidase in the xylem of silver birch and Karelian birch

was quantified. Acidic isoforms of the enzyme were shown to have higher activity compared to basic ones in both birch forms. In acidic conditions, peroxidase activity did not differ between silver and Karelian birch. In basic conditions, peroxidase activity was significantly higher in Karelian birch xylem. The resultant data generally indicate a higher oxidative capacity of peroxidase in Karelian birch xylem owing to a more active participation of all isoforms in the oxidation of quercetin. It is hypothesized that plant tissues with non-standard enzymatic activity may be sources of biologically active substances and be used in biocatalysis processes.

Key words: *Betula pendula* var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti; *Betula pendula* Roth var. *pendula*; peroxidase (POD); quercetin; pH.

Введение

Ткани растений с высокой оксидазной ферментативной активностью широко используются в процессах биокатализа. Они могут быть источниками биологически активных фенольных веществ и служить сырьем для получения различных ферментных препаратов. Среди оксидаз пероксидазы (ПОД) обладают более высоким окислительно-восстановительным потенциалом, в связи с чем их часто используют в биокаталитических реакциях галогенирования, полимеризации, синтеза полифенолов, хинонов, для ускорения образования углерод-углеродных связей [Burton, 2003; Borges et al., 2017]. Растительные ПОД являются непосредственными участниками биосинтеза компонентов клеточных стенок (лигнина, целлюлозы и гемицеллюлоз), которые широко применимы в химической промышленности, биоэнергетике, агротехнологиях и т. д. [Chen, 2014]. В этой связи древесные растения, отличающиеся разнообразием компонентов вторичных клеточных стенок, могут быть использованы в качестве сырья для извлечения ферментных препаратов и биологически активных веществ.

Для изучения пероксидазных процессов и возможности их применения в биокатализе при различных условиях важное значение имеет подбор субстрата окисления, который позволяет рассмотреть активность фермента в широком диапазоне pH, включая как физиологические значения, так и экстремальные условия, применяемые в различных отраслях промышленности. Таким признанным субстратом является кверцетин, который в зависимости от pH имеет разную степень ионизации и разное количество электроактивных центров [Jovanovic et al., 1994; Brett, Ghica, 2003; Червяковский и др., 2009], в связи с чем его окисление пероксидазами различается в диапазоне pH.

Кверцетин относится к подклассу флавонолов из класса флавоноидов [Запрометов,

1993], их отличает наличие гидроксильной группы в С3 положении.

Из всех флавоноидов флаванолы, в том числе кверцетин, наиболее склонны к окислению. Они способны окисляться растительными пероксидазами с достаточно высокими скоростями [Schreiber, 1974; Chan et al., 1999; Takahama, Oniki, 2000]. Вероятно, кверцетин и ему подобные соединения – природные субстраты для ПОД. Для растений процесс окисления флавоноидов является неотъемлемым процессом нормального роста и развития [Taylor, Grote-wold, 2005; Pourcel et al., 2006].

Кверцетин является продуктом окисления природного дегидрокверцетина, наличие которого присуще древесным растениям. Оба этих фенольных соединения находят широкое применение в пищевой промышленности, нейтрализуя активные формы кислорода, в качестве антиоксидантов. В медицине дегидрокверцетин и кверцетин применяются для лечения лучевой болезни, септического эндокардита, для профилактики поражений капилляров и др. Кверцетин ингибирует гиалуронидазу, защищает от окисления аскорбиновую кислоту и адреналин [Рогожин, Перетолчин, 2009].

Наши предыдущие исследования показали, что у двух форм березы повислой, различающихся по текстуре древесины, – обычной березы повислой (*Betula pendula* Roth var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti) ПОД проявляет разную активность и может служить биохимическим маркером нарушений ксилогенеза [Галибина и др., 2013, 2016; Никерова, Галибина, 2017; Никерова и др., 2018]. Предполагая, что ткани с нестандартной ферментативной активностью могут использоваться в процессах биокатализа, мы провели сравнительное изучение активности ПОД в ксилеме 40-летних деревьев обычной березы повислой и карельской березы с использованием кверцетина в качестве субстрата пероксидазного окисления в широком диапазоне pH.

Объекты и методы исследования

Растительный материал

Объектами исследования были 40-летние деревья обычной березы повислой (*Betula pendula* var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*). Все растения произрастали в одинаковых почвенно-климатических условиях на Агробиологической станции КарНЦ РАН (61°45' с. ш. 34°20' в. д.) в 2 км от г. Петрозаводска, Республика Карелия. Отбор образцов проводили в феврале. В это время растения находились в состоянии вынужденного покоя.

На стволе березы вырезали «окошки» 4×6 см и отделяли кору от древесины. С обнаженной поверхности древесины бритвенным лезвием отбирали ткани ксилемы. У узорчатых растений ткани отбирали из участков ствола с характерными вздутиями, неровностями, крупными бугорками и бугорчатыми выпуклостями. Весь растительный материал замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературной морозильной камере при –70 °С.

Биохимические исследования

Растительный материал растирали с жидким азотом и гомогенизировали в среде следующего состава: 50 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 7,8), 0,5 мМ ЭДТА; соотношение ткань : буфер – 1 : 10. После 20-минутной экстракции гомогенат дважды центрифугировали при 10000 г в течение 15 минут при 4 °С (центрифуга MPW-351R, Польша) [Никерова и др., 2016]. В полученном супернатанте определяли активность пероксидазы (спектрофотометр СФ-2000, «ОКБ Спектр», Россия) [Галибина и др., 2013].

Для определения активности ПОД в качестве донора водорода использовали кверцетин, в качестве субстрата – перекись водорода. Инкубационная среда для определения активности ПОД содержала: соответствующий буфер, 5,2 мМ перекись водорода и 22,1 мкМ кверцетин, который предварительно растворяли в спирте при нагревании на водяной бане. Время инкубации – 20 минут. Активность ПОД оценивали по убыли оптической плотности кверцетина на соответствующей длине волны при каждом исследуемом рН и выражали как израсходовано мкмоль кверцетина / г сырой ткани за 10 мин.

Для рН 4, 5, 6, 7 – готовили цитратно-фосфатный буфер на основе 0,1 М лимонной кислоты и 0,2 М дигидрофосфата натрия. Для рН 8, 9, 10 – буфер на основе 0,1 М хлорида ка-

лия, 0,1 М борной кислоты и 0,1 М гидроксида натрия [Лурье, 1971].

Обработка данных осуществлялась в среде Microsoft Excel. Эксперименты проводились в четырех биологических повторностях, аналитическая повторность – двукратная. Приведены средние значения и их стандартные ошибки. Для оценки значимости различий использовали t-критерий Стьюдента.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты

Максимумы поглощения кверцетина в диапазоне рН

Об активности ПОД судили по уменьшению оптической плотности в области поглощения кверцетина, поэтому для каждого значения рН (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) определяли максимум поглощения (λ , нм) и строили калибровочные графики зависимости оптической плотности от концентрации кверцетина. С возрастанием рН происходил сдвиг максимума поглощения в более длинноволновую область. Так, при рН 4 максимум поглощения соответствовал 353,7 нм, а при рН 10 – уже 384,7 нм (рис. 1).

Изменение активности пероксидазы в ксилеме у *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* в диапазоне рН

У растений *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* в ксилеме динамика активности ПОД в изучаемом диапазоне рН имела схожие тенденции (рис. 2). Так, у обеих форм березы при переходе из кислой в щелочную среду происходило понижение активности ПОД. Особенно резкое снижение пероксидазной активности наблюдали при переходе рН от 7 до 9. При переходе рН от 9 до 10 происходило повышение активности ПОД.

В целом активность ПОД в кислой среде была выше, чем в щелочной, но не имела значимых отличий между изучаемыми формами. В нейтральной среде при рН 7 наметилась тенденция к более высокой активности ПОД в ксилеме карельской березы. В щелочной среде активность ПОД у карельской березы была значимо выше, чем у обычной березы повислой: при рН 8 – в 2,5 раза, а при рН 9 и 10 – в 1,8 раза соответственно.

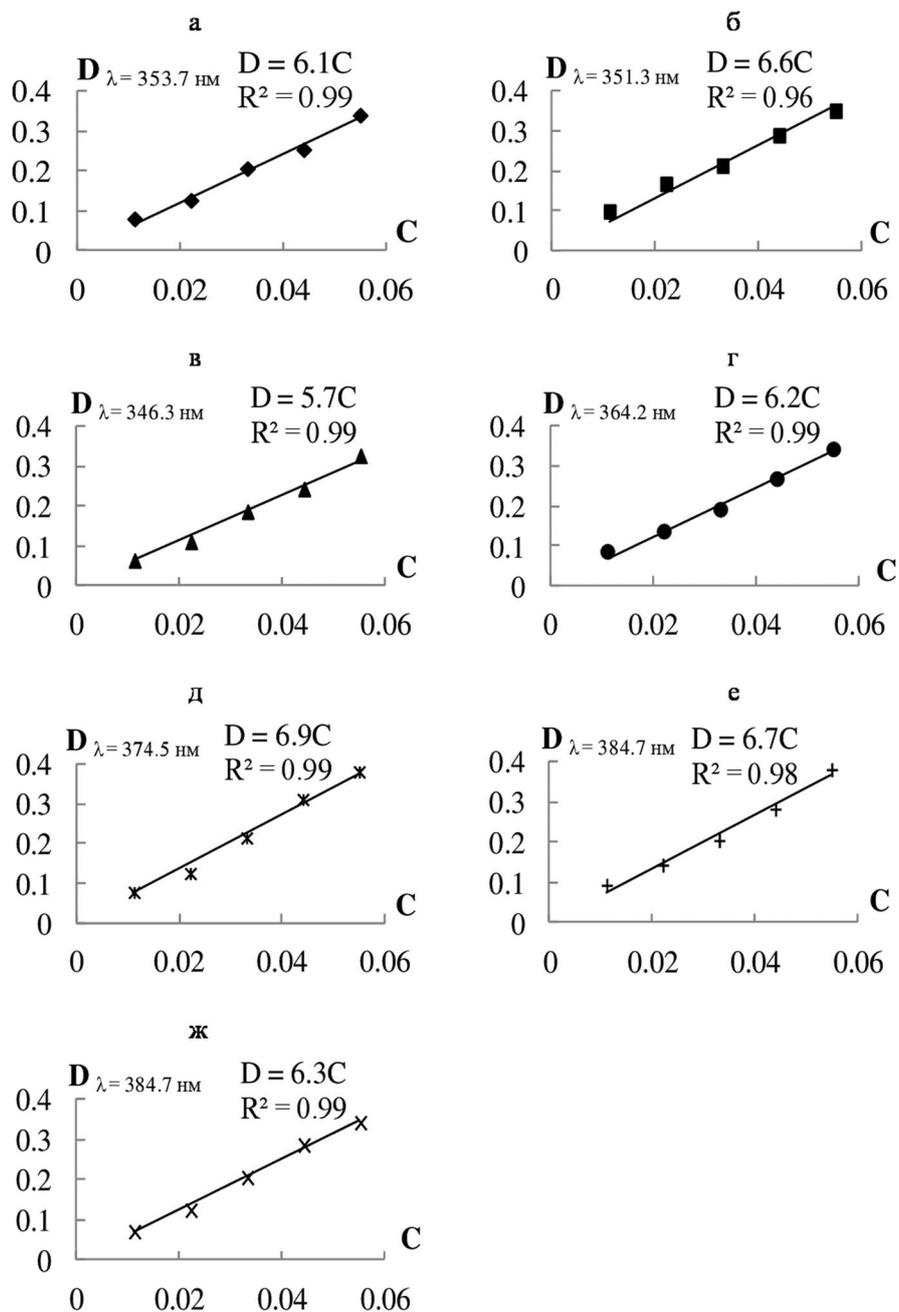


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от концентрации кверцетина при исследуемых рН: а – 4, б – 5, в – 6, г – 7, д – 8, е – 9, ж – 10. Приведены уравнения зависимости оптической плотности (D) от концентрации кверцетина (C, ммоль/л), значение коэффициента аппроксимации (R²) и максимума поглощения (λ, нм)

Fig. 1. The dependence of optical density on the quercetin concentration in the studied pH: а – 4, б – 5, в – 6, г – 7, д – 8, е – 9, ж – 10. The equations of dependence of optical density (D) on the quercetin concentration (C, mmol/l), coefficient of approximation (R²) and absorption maximum (λ, nm) are shown

Исследование протекания реакции пероксидазного окисления кверцетина во времени у карельской березы

Поскольку активность ПОД у карельской березы в ксилеме была в целом более вы-

сокой, дальнейшее изучение реакции окисления кверцетина пероксидазой проводили на этой ткани. Учитывая уравнения зависимости оптической плотности от концентрации кверцетина (рис. 1), строили графики зависимости активности фермента от времени про-

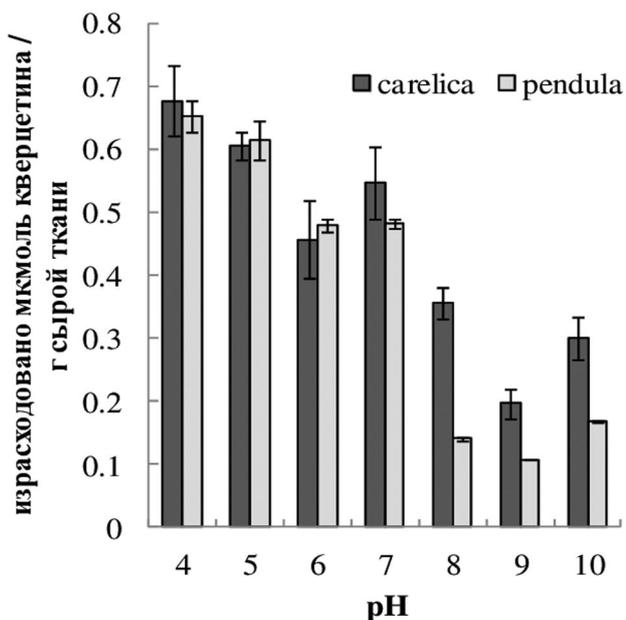


Рис. 2. Активность ПОД (израсходовано мкмоль кверцетина / г сырой ткани) у *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* при различных pH

Fig. 2. POD activity (consumed μmol quercetin / g FW) in *B. pendula* var. *pendula* and *B. pendula* var. *carelica* under different pH

текания реакции (3, 5, 7, 10, 15 и 20 мин) (рис. 3).

В течение 20 мин во всех исследуемых pH происходило уменьшение оптической плотности кверцетина, что свидетельствовало об убыли субстрата в связи с его расходом в реакции пероксидазного окисления, вследствие чего пероксидазная активность увеличивалась. Спустя 20 мин в кислой среде реакция практически останавливалась, что не было связано с недостатком субстрата, а определялось возможностями ферментного препарата и реакционной способностью кверцетина при каждом pH.

Окисление протекало более равномерно при pH 8 и 9, о чем можно судить по характеру уравнений линий тренда. Только в этих условиях уравнение зависимости скорости реакции от времени имело вид прямой пропорциональности (рис. 3, д, е). Тогда как в кислых и нейтральных условиях имело место быстрое увеличение активности пероксидазы в первые минуты реакции. Особенно обращает на себя внимание коэффициент аппроксимации уравнения линейной функции при pH 8, описывающий зависимость активности ПОД от времени, который равен 0,99. При pH 9 и 10 значения активности пероксидазы ниже, чем при других исследуемых pH.

Обсуждение

Ранее при использовании в качестве субстратов пероксидазного окисления бензидина и гваякола мы показали, что активность ПОД у растений карельской березы выше, по сравнению с обычной березой повислой, в тканях ксилемы [Галибина и др., 2013; Никерова, Галибина, 2017; Никерова и др., 2018] как в период покоя, так и в период активного камбиального роста. Более того, активность основных изоформ фермента [Никерова и др., 2018] была ниже, чем кислых [Галибина и др., 2013; Никерова, Галибина, 2017], что подтвердило настоящее исследование с использованием кверцетина в качестве субстрата окисления.

Однако при использовании других субстратов мы отмечали, что и в кислой среде активность ПОД у карельской березы намного превышала таковую у обычной березы и, кроме того, разница между активностью кислых и основных изоформ была более значительной. При использовании кверцетина в кислой среде не было обнаружено достоверных отличий в активности ПОД у двух форм березы. Вероятно, причина заключается в окислительных способностях кверцетина при различных условиях pH. Рассмотрим химизм процесса более подробно.

Реакционная способность флавоноидов зависит от многих факторов, которые могут изменять их константы диссоциации. Один из главных – степень ионизации гидроксильных группировок флавоноида [Slabbert et al., 1977], которая вызывает отрыв электронов. Разные флавоноиды подвержены процессу окисления в большей или меньшей степени. Способность к окислению определяют методом циклической вольтамперометрии [Jovanovic et al., 1994] по величине окислительно-восстановительного потенциала соединения (ОВП). Чем ниже ОВП, тем выше склонность к окислению. Вольтамперограммы флавоноидов представляют собой кривые с несколькими пиками [Brett, Ghica, 2003], количество которых соответствует числу электроактивных центров в структуре соединения, они формируются в основном за счет свободных гидроксильных групп, которые подвержены окислению. На окислительно-восстановительные свойства могут оказывать влияние и другие особенности строения, например, присутствие карбонильной группы и ненасыщенных связей [Червяковский и др., 2009].

Кверцетин (рис. 4) – один из самых хорошо окисляемых флавоноидов. При pH 7,7 у него регистрируются четыре пика окисления: при +0,15; +0,30; +0,60 и +0,80 В. Окислительный процесс протекает по каскадному механиз-

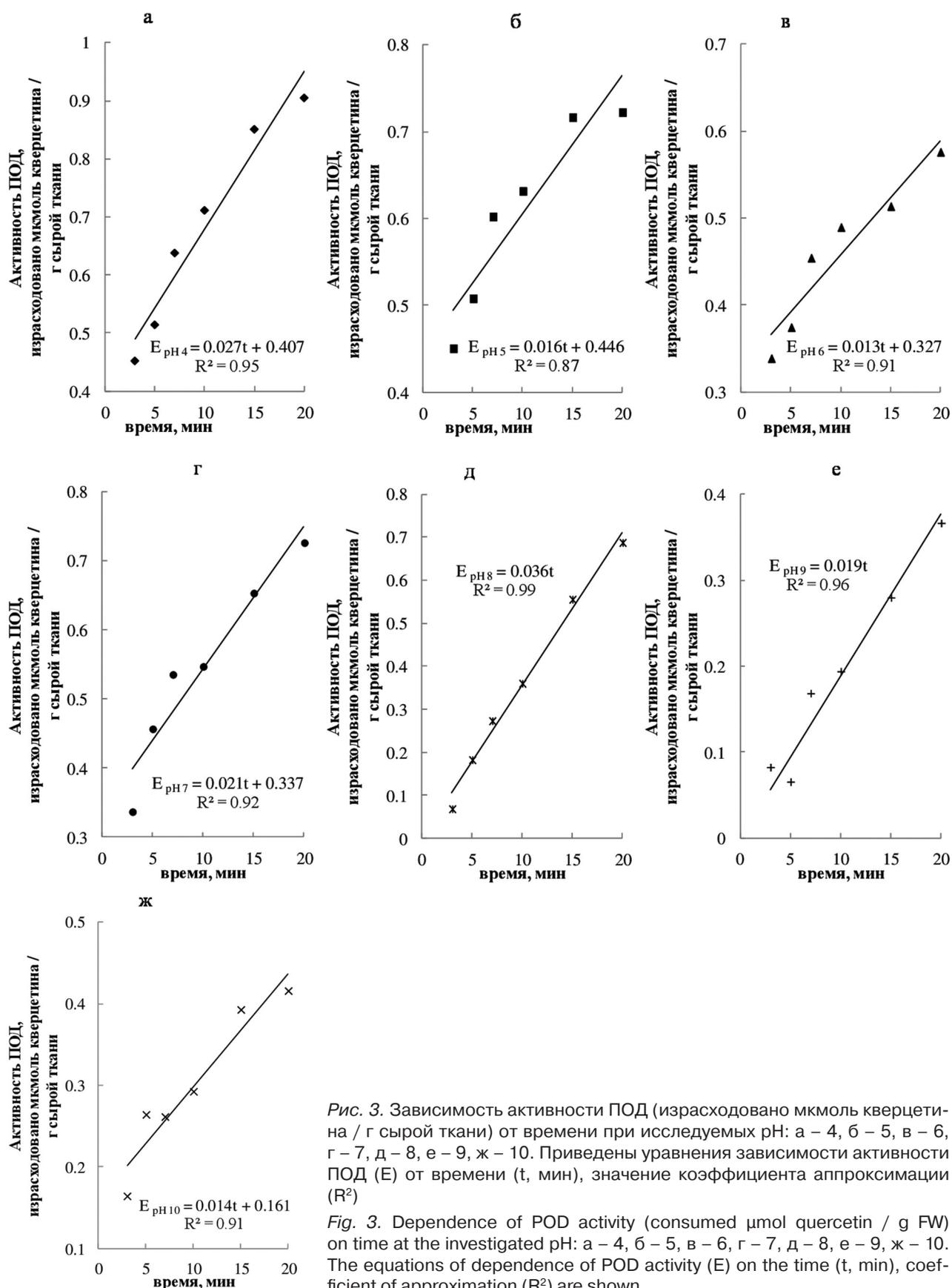


Рис. 3. Зависимость активности ПОД (израсходовано мкмоль кверцетина / г сырой ткани) от времени при исследуемых pH: а – 4, б – 5, в – 6, г – 7, д – 8, е – 9, ж – 10. Приведены уравнения зависимости активности ПОД (E) от времени (t, мин), значение коэффициента аппроксимации (R^2)

Fig. 3. Dependence of POD activity (consumed μmol quercetin / g FW) on time at the investigated pH: а – 4, б – 5, в – 6, г – 7, д – 8, е – 9, ж – 10. The equations of dependence of POD activity (E) on the time (t, min), coefficient of approximation (R^2) are shown

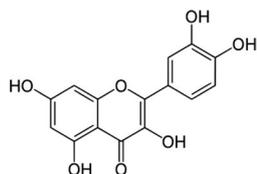


Рис. 4. Кверцетин

Fig. 4. Quercetin

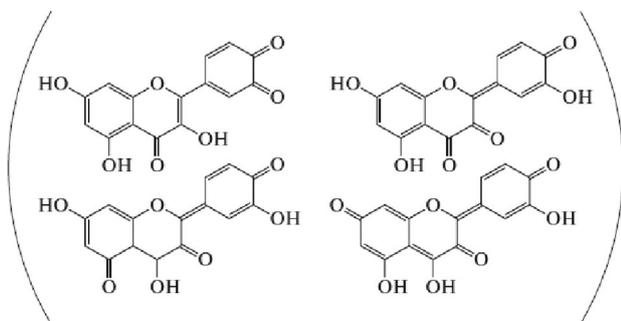


Рис. 5. Продукты окисления кверцетина пероксидазой [Boots et al., 2003]

Fig. 5. Products of peroxidase oxidation of quercetin [Boots et al., 2003]

му с вовлечением различных электроактивных структур. В щелочной среде флавоноиды, и кверцетин в том числе [Slabbert et al., 1977; Boots et al., 2003; Brett, Ghica, 2003], находятся преимущественно в ионизированной неустойчивой форме, следовательно, могут быть подвержены активному окислению и являться пероксидазными субстратами.

Сложно однозначно предположить, какие продукты образуются в результате ферментативного окисления флавоноидов, так как, вероятно, промежуточные продукты также вступают во взаимодействие с молекулой фермента и, кроме того, претерпевают ряд неферментативных превращений [Барсукова и др., 2017]. Boots с соавторами показали, что при окислении кверцетина пероксидазой в условиях pH 7,4, $C[H_2O_2] = 33$ мкМ/л образуется только один продукт – кверцетин-ортохинон, и существовать он может в представленных на рис. 5 таутомерных формах [Boots et al., 2003].

В нашем исследовании стабильное равномерное окисление было отмечено при pH 8 и 9, уравнения зависимости ПОД от времени в этих условиях имели вид прямой пропорциональности с близкими к единице коэффициентами аппроксимации (рис. 3, д, е).

Исходя из вышесказанного можно предположить, что в кислой среде, где окислительные возможности кверцетина ограничены ввиду слабой ионизации, у обычной березы повислой и карельской березы наблюдается пре-

дел активности фермента. В первые минуты реакция шла активно, затем практически останавливалась к 20-й минуте. Недостатка субстрата или фермента в наблюдаемых реакциях не было, поэтому, вероятно, сродство субстрата и фермента из-за малой ионизации в кислой среде оказывается недостаточным, не давая возможности ферменту показать свои полноценные окислительные способности. Об этом свидетельствуют и более низкие коэффициенты аппроксимации уравнений, описывающих зависимость активности фермента во времени, и заметная неравномерность протекания реакций, которая выражается тем фактом, что за равные промежутки времени активность фермента изменялась по-разному. Вероятно, это обусловлено взаимодействием активного центра фермента и слабоионизированного субстрата.

Другая вероятная причина отсутствия отличий у изучаемых форм в кислой среде – период отбора растительных тканей. Образцы ксилемы были взяты в феврале, когда растения находились в состоянии вынужденного покоя, то есть все ферментные изменения были обусловлены в первую очередь влиянием внешних факторов, в основном температуры, активных метаболических процессов в изучаемых тканях не происходило [Галибина и др., 2013]. Обычно изменения внешних условий отражаются в более высокой активности кислых пероксидаз [Gaspar et al., 1985]. Поэтому, вероятно, практически одинаковая высокая активность кислых изоформ у обеих изучаемых форм березы могла быть одинаковым ответом на условия внешней среды, а активность протекания метаболических процессов характеризовали основные изоформы фермента.

Кроме того, именно в кислых условиях наблюдается двойственная картина поведения кверцетина: и как очень активного антиоксиданта, и как субстрата для пероксидазного окисления. Действие кверцетина-антиоксиданта может ингибировать пероксидазную активность в кислой среде и даже при нейтральных pH [Rogozhin, Verkhoturov, 1998; Метелица, Карасева, 2007; Dueñas et al., 2010], что, в свою очередь, может ограничивать активность ПОД.

Для изучения антиоксидантной активности в различных органах и тканях травянистых и древесных растений часто выбирают именно кислые условия среды инкубации, однако изучение механизмов реакций антиоксидантного окисления в основных условиях среды инкубации не менее важно ввиду их распространенности в естественных биологических процессах [Dueñas et al., 2010]. Также важен правильный

подбор субстрата окисления для разных условий среды. Не все субстраты позволят изучать пероксидазную активность в широком диапазоне. Достаточно высокий pH, близкий к 8 и чуть выше, может быть обнаружен в митохондриях, пероксисомах растительных клеток [Shen et al., 2013]. Логично, что эти компартменты являются привычным местом локализации пероксидаз [Половникова, 2010].

На основании проведенного исследования можно предположить, что в период вынужденного покоя основные изоформы пероксидазы в реакции окисления кверцетина могут являться биохимическим маркером аномального ксилогенеза у карельской березы. Активное участие кислых пероксидаз в ответных реакциях организма на изменение температуры окружающей среды не позволяет в полной мере выявить их разное участие в метаболизме у обычной березы повислой и карельской березы, биохимическим маркером которого, как мы уже не раз показывали в предыдущих исследованиях, может являться повышенная активность ПОД.

Более высокая активность ПОД карельской березы в реакциях окисления кверцетина в основных условиях среды инкубации, вероятно, может быть использована в биокаталитических процессах ввиду нестандартной работы фермента как в физиологических, так и в экстремально щелочных (pH 9 и 10) условиях, и это может быть применимо в различных синтетических процессах окисления фенольных соединений. Предполагаем, что ткани ксилемы карельской березы могут являться сырьем для извлечения необычных изоформ фермента, работающих в очень широком диапазоне pH.

Заключение

В настоящей работе впервые было проведено изучение активности ПОД в ксилеме двух форм 40-летних деревьев березы повислой – обычной березы повислой (*B. pendula* var. *pendula*) и карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) с использованием кверцетина в качестве субстрата пероксидазного окисления в диапазоне pH.

Данная работа продолжает ряд уже опубликованных исследований, которые показывают различные биохимические стратегии ферментов АОС в процессах нормального и аномального ксилогенеза у карельской березы. Выдвинута гипотеза о возможности использования основных изоформ пероксидаз в реакции окисления кверцетина в качестве биохимического маркера аномального ксилогенеза в период вынужденного покоя. Кроме того, вероятно,

аномальные ткани карельской березы с выявленными закономерностями ферментативной активности и широким спектром изоформ ПОД могут быть использованы в различных биотехнологических процессах.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (Институт леса КарНЦ РАН) и при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-04-100639_p_a).

Литература

Барсукова М. Е., Токарева А. И., Буслова Т. С., Малинина Л. И., Веселова И. А., Шеховцова Т. Н. Кинетика окисления флавоноидов в водной и водно-органической средах в присутствии пероксидазы, тирозиназы и гемоглобина // Прикл. биохим. и микробиол. 2017. Т. 53, № 2. С. 146–154. doi: 10.7868/S0555109917020052

Галибина Н. А., Мошкина Е. В., Никерова К. М., Мощенская Ю. Л., Знаменский С. Р. Активность пероксидазы как индикатор степени узорчатости древесины карельской березы // Лесоведение. 2016. № 4. С. 294–304.

Галибина Н. А., Целищева Ю. Л., Андреев В. П., Софронова И. Н., Никерова К. М. Активность пероксидазы в органах и тканях деревьев березы повислой // Ученые записки ПетрГУ. Серия Естественные и технические науки. 2013. Т. 133, № 4. С. 7–13.

Запрометов М. Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.

Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1971. 456 с.

Метелица Д. И., Карасева Е. И. Иницирование и ингибирование свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидных системах (обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. 2007. Т. 43, № 5. С. 537–564.

Никерова К. М., Галибина Н. А. Влияние нитратного азота на пероксидазную активность в тканях *Betula pendula* Roth var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin) // Сибирский лесной журнал. 2017. № 1. С. 15–24.

Никерова К. М., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Каталазная активность в листовом аппарате у сеянцев березы повислой разных форм (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* и var. *carelica* (Mercklin) // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 11. С. 68–77. doi: 10.17076/eb460

Никерова К. М., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Ферменты антиоксидантной системы – индикаторы разных сценариев ксилогенеза: в раннем онтогенезе и во взрослом состоянии (на примере *Betula pendula* Roth) // Труды КарНЦ РАН. 2018. № 6. С. 68–80. doi: 10.17076/eb787

Половникова М. Г. Экофизиология стресса. СПб.: Изд-во Марийского ун-та, 2010. 256 с.

Рогожин В. В., Перетолчин Д. В. Кинетические закономерности окисления дигидрохверцетина пероксидазой хрена // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35, № 5. С. 640–645.

Червяковский Е. М., Курченко В. П., Костюк В. А. Роль флавоноидов в биологических реакциях с переносом электронов // Труды БГУ. 2009. Т. 4, ч. 1. С. 9–26.

Boots A. W., Kubben N., Haenen G. R. M. M., Bast A. Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. Vol. 308, no. 3. P. 560–565. doi: 10.1016/S0006-291X(03)01438-4

Borges C. V., Minatel I. O., Gomez-Gomez H. A., Lima G. P. P. Medicinal Plants: Influence of Environmental Factors on the Content of Secondary Metabolites // Medicinal Plants and Environmental Challenges / Eds. M. Ghorbanpour, A. Varma. Cham: Springer, 2017. P. 259–278. doi: 10.1007/978-3-319-68717-9_15

Brett A. M. O., Ghica M. E. Electrochemical oxidation of quercetin // Electroanal. 2003. Vol. 15, no. 22. P. 1745–1750. doi: 10.1002/elan.200302800

Burton S. G. Oxidizing enzymes as biocatalysts // Trends Biotechnol. 2003. Vol. 21, no. 12. P. 543–549. doi: 10.1016/j.tibtech.2003.10.006

Chan T., Galati G., O'Brien P. J. Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones // Chem. Biol. Interact. 1999. Vol. 122, no. 1. P. 15–25. doi: 10.1016/S0009-2797(99)00103-9

Chen H. Chemical composition and structure of natural lignocelluloses // Biotechnology of Lignocellulose: theory and practices / Eds. H. Chen. Dordrecht: Springer, 2014. P. 25–71. doi: 10.1007/978-94-007-6898-7_2

Dueñas M., González-Manzano S., González-Paramás A., Santos-Buelga C. Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin

and Quercetin // J. Pharm. Biomed. Anal. 2010. Vol. 51, no. 2. P. 443–449. doi: 10.1016/j.jpba.2009.04.007

Gaspar T., Penel C., Castillo F. J., Greppin H. A two step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development // Physiol. Plant. 1985. Vol. 64, no. 3. P. 418–423. doi: 10.1111/j.1399-3054.1985.tb03362.x

Jovanovic S. V. Flavonoids as antioxidants // J. Am. Chem. Soc. 1994. Vol. 116, no. 11. P. 4846–4851. doi: 10.1021/ja00090a032

Pourcel L., Routaboul J.-M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions // Trends Plant Sci. 2006. Vol. 12, no. 1. P. 29–36. doi: 10.1016/j.tplants.2006.11.006

Rogozhin V. V., Verkhoturov V. V. Effect of antioxidants (digoxin, quercetin, and ascorbic acid) on catalytic properties of horseradish peroxidase // Biochemistry (Mosc). 1998. Vol. 63, no. 6. P. 657–661.

Schreiber W. Action of horse radish peroxidase upon some flavones // FEBS Lett. 1974. Vol. 41, no. 1. P. 50–52. doi: 10.1016/0014-5793(74)80951-8

Shen J., Zeng Y., Zhuang X., Sun L., Yao X., Pimpl P., Jiang L. Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system // Mol. Plant. 2013. Vol. 6, no. 5. P. 1419–1437. doi: 10.1093/mp/ssst079

Slabbert N. P. Ionisation of some flavanols and dihydroflavonols // Tetrahedron. 1977. Vol. 33, no. 7. P. 821–824. doi: 10.1016/0040-4020(77)80200-7

Takahama U., Oniki T. Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions // J. Plant Res. 2000. Vol. 113, no. 3. P. 301–309. doi: 10.1007/PL00013933

Taylor L. P., Grotewold E. Flavonoids as developmental regulators // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. Vol. 8, no. 3. P. 317–323. doi: 10.1016/j.pbi.2005.03.005

Поступила в редакцию 19.09.2018

References

Chervyakovskii E. M., Kurchenko V. P., Kostyuk V. A. Rol' flavonoidov v biologicheskikh reaktsiyakh s perenosom elektronov [The role of flavonoids in biological reactions with electron transfer]. *Trudy BGU*. 2009. Vol. 4, no. 1. P. 9–26.

Galibina N. A., Moshkina E. V., Nikerova K. M., Moshchenskaya Yu. L., Znamenskii S. R. Aktivnost' peroksidazy kak indikator stepeni uzorchatosti drevesiny karel'skoi berezy [Peroxidase activity indicates veining of curly birch]. *Lesovedenie* [Russ. J. Forest Sci.]. 2016. No. 4. P. 294–304.

Galibina N. A., Tselishcheva Yu. L., Andreev V. P., Sofronova I. N., Nikerova K. M. Aktivnost' peroksidazy v organakh i tkanyakh derev'ev berezy povislou [Peroxidase activity in organs and tissues of silver birch trees]. *Uchenye zapiski PetrGU. Ser. Estestvennyye i tehnicheckie nauki* [Proceed. of Petrozavodsk St. Univ. Ser. Nat. Tech. Sci.]. 2013. Vol. 133, no. 4. P. 7–13.

Lur'e Yu. Yu. Spravochnik po analiticheskoi khimii [Handbook of analytical chemistry]. Moscow: Khimiya, 1971. 456 p.

Nikerova K. M., Galibina N. A. Vliyanie nitratnogo azota na peroksidaznuyu aktivnost' v tkanyakh *Betula pendula* Roth var. *pendula* i *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin) [The influence of nitrate on the peroxidase activity in tissues of *Betula pendula* Roth var. *pendula* and *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin)]. *Sibirskii lesnoi zhurn.* [Siberian J. Forest Sci.]. 2017. No. 1. P. 15–24.

Nikerova K. M., Galibina N. A., Moshchenskaya Yu. L., Novitskaya L. L., Podgornaya M. N., Sofronova I. N. Katalaznaya aktivnost' v listovom apparate u seyantsev berezy povislou raznykh form (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* i var. *carelica* (Mercklin) [Catalase activity in leaves of silver birch seedlings of different forms (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* and var. *carelica* (Mercklin)]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2016. No. 11. P. 78–87. doi: 10.17076/eb460

Nikerova K. M., Galibina N. A., Moshchenskaya Yu. L., Novitskaya L. L., Podgornaya M. N., Sofronova I. N. Fermenty antioksidantnoi sistemy – indikatorы raznykh stsenariyev ksilogeneza: v rannem ontogeneze i vo vzrosлом sostoyanii (na primere *Betula pendula* Roth) [The an-

tiioxidant enzymes – indicators of different xylogenesis scenarios: in early ontogeny and in adult plants (example of *Betula pendula* Roth)]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2018. No. 6. P. 68–80. doi: 10.17076/eb787

Polovnikova M. G. Ekofiziologiya stressa [Ecophysiology of stress]. St. Petersburg: Izd-vo Mariiskogo un-ta, 2010. 256 p.

Zaprometov M. N. Fenol'nye soedineniya. Rasprostranenie, metabolism i funktsii v rasteniyakh [Phenolic compounds. Occurrence, metabolism, and functions in plants]. Moscow: Nauka, 1993. 272 p.

Barsukova M. E., Tokareva A. I., Buslova T. S., Malinina L. I., Veselova I. A., Shekhovtsova T. N. Flavonoid oxidation kinetics in aqueous and aqueous organic media in the presence of peroxidase, tyrosinase, and hemoglobin. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2017. Vol. 53, no. 2. P. 149–156. doi: 10.1134/S0003683817020053

Boots A. W., Kubben N., Haenen G. R. M. M., Bast A. Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Vol. 308, no. 3. P. 560–565. doi: 10.1016/S0006-291X(03)01438-4

Borges C. V., Minatel I. O., Gomez-Gomez H. A., Lima G. P. P. Medicinal Plants: Influence of Environmental Factors on the Content of Secondary Metabolites. *Medicinal Plants and Environmental Challenges*. Cham: Springer, 2017. P. 259–278. doi: 10.1007/978-3-319-68717-9_15

Brett A. M. O., Ghica M. E. Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanal.* 2003. Vol. 15, no. 22. P. 1745–1750. doi: 10.1002/elan.200302800

Burton S. G. Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends Biotechnol.* 2003. Vol. 21, no. 12. P. 543–549. doi: 10.1016/j.tibtech.2003.10.006

Chan T., Galati G., O'Brien P. J. Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones. *Chem. Biol. Interact.* 1999. Vol. 122, no. 1. P. 15–25. doi: 10.1016/S0009-2797(99)00103-9

Chen H. Chemical composition and structure of natural lignocelluloses. *Biotechnology of Lignocellulose: theory and practices*. Dordrecht: Springer, 2014. P. 25–71. doi: 10.1007/978-94-007-6898-7_2

Dueñas M., González-Manzano S., González-Paramás A., Santos-Buelga C. Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin

and Quercetin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010. Vol. 51, no. 2. P. 443–449. doi: 10.1016/j.jpba.2009.04.007

Gaspar T., Penel C., Castillo F. J., Greppin H. A two step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plant.* 1985. Vol. 64, no. 3. P. 418–423. doi: 10.1111/j.1399-3054.1985.tb03362.x

Jovanovic S. V. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 1994. Vol. 116, no. 11. P. 4846–4851. doi: 10.1021/ja00090a032

Metelitzka D. I., Karasyova E. I. Initiation and inhibition of free-radical processes in biochemical peroxide systems: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2007. Vol. 43, no. 5. P. 481–505. doi: 10.1134/S000368380705002X

Pourcel L., Routaboul J.-M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci.* 2006. Vol. 12, no. 1. P. 29–36. doi: 10.1016/j.tplants.2006.11.006

Rogozhin V. V., Peretolchin D. V. Kinetic regulations of dihydroquercetin oxidation with horseradish peroxidase. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2009. Vol. 35, no. 5. P. 576–580. doi: 10.1134/S1068162009050069

Rogozhin V. V., Verkhoturov V. V. Effect of antioxidants (digoxin, quercetin, and ascorbic acid) on catalytic properties of horseradish peroxidase. *Biochemistry (Mosc)*. 1998. Vol. 63, no. 6. P. 657–661.

Schreiber W. Action of horse radish peroxidase upon some flavones. *FEBS Lett.* 1974. Vol. 41, no. 1. P. 50–52. doi: 10.1016/0014-5793(74)80951-8

Shen J., Zeng Y., Zhuang X., Sun L., Yao X., Pimpl P., Jiang L. Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Mol. Plant.* 2013. Vol. 6, no. 5. P. 1419–1437. doi: 10.1093/mp/sst079

Slabbert N. P. Ionisation of some flavanols and dihydroflavonols. *Tetrahedron.* 1977. Vol. 33, no. 7. P. 821–824. doi: 10.1016/0040-4020(77)80200-7

Takahama U., Oniki T. Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions. *J. Plant Res.* 2000. Vol. 113, no. 3. P. 301–309. doi: 10.1007/PL00013933

Taylor L. P., Grotewold E. Flavonoids as developmental regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. Vol. 8, no. 3. P. 317–323. doi: 10.1016/j.pbi.2005.03.005

Received September 19, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Никерова Ксения Михайловна

руководитель аналитической лаборатории
Институт леса КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: knikerova@yandex.ru
тел.: (8142) 768160

CONTRIBUTORS:

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

Галибина Наталия Алексеевна

и. о. заместителя директора по научной работе, к. б. н.
Институт леса КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: galibina@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

Мощенская Юлия Леонидовна

младший научный сотрудник лаб. физиологии и цитологии
древесных растений, к. б. н.
Институт леса КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: tselishcheva.yulia@mail.ru
тел.: (8142) 568216

Новицкая Людмила Львовична

заведующая лаб. физиологии и цитологии древесных
растений, д. б. н.
Институт леса КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: novits@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 568216

Бородина Марина Николаевна

ведущий биолог лаб. физиологии и цитологии древесных
растений
Институт леса КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: marishka89.11@list.ru
тел.: (8142) 568216

Софронова Ирина Николаевна

ведущий биолог лаб. физиологии и цитологии древесных
растений
Институт леса КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: sofronova_ira@mail.ru
тел.: (8142) 568216

Galibina, Natalia

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

Moshchenskaya, Yuliya

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

Novitskaya, Ludmila

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

Borodina, Marina

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: marishka89.11@list.ru
tel.: (8142) 568216

Sofronova, Irina

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

УДК 581.5

ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ВОДООБМЕН ХВОЙНОГО И ЛИСТВЕННОГО ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

В. Б. Придача, Г. П. Тихова, Т. А. Сазонова

Институт леса КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

Проведено исследование влияния абиотических факторов (интенсивности ФАР, температуры и относительной влажности воздуха, дефицита упругости водяного пара) на суточные ритмы водного потенциала облиственных (охвоенных) побегов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и березы повислой (*Betula pendula* Roth) в вегетационной динамике в условиях сосняка черничного свежего европейской части средней тайги (Южная Карелия). На основе анализа модельных данных установлено, что вклады ведущих факторов среды в формирование величины водного потенциала для хвойного и лиственного растения сопоставимы и межвидовые различия не обнаружены. Показано сходство доминирования ведущих факторов для обоих видов, в частности, в июле – интенсивности ФАР, в августе – относительной влажности воздуха, в сентябре – температуры воздуха. Между тем в июне выявлены значимые межвидовые отличия доминирующего влияния факторов среды на водный обмен сосны обыкновенной (относительной влажности воздуха) и березы повислой (интенсивности ФАР). Предполагается, что выявленные различия обусловлены биологическими особенностями формирования побегов и листьев (хвои) хвойного и лиственного растения в период интенсивного роста. Кроме того, отмечена некоторая инертность отклика водного потенциала облиственных (охвоенных) побегов древесных растений на резкие изменения абиотических факторов в течение суток, что обусловлено механизмом эндогенной регуляции водного обмена. Выявленное сходство ведущих абиотических факторов и их вклада в формирование величины водного потенциала хвойного и лиственного древесных растений в вегетационной динамике указывает на сходные механизмы адаптации систематически разных видов, произрастающих в одном климатическом регионе.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L.; *Betula pendula* Roth; водный потенциал; суточный ритм; сезонная динамика; факторы внешней среды.

V. B. Pridacha, G. P. Tikhova, T. A. Sazonova. THE EFFECT OF ABIOTIC FACTORS ON WATER EXCHANGE IN CONIFEROUS AND DECIDUOUS PLANTS

The effects of abiotic factors (rate of PAR, air temperature and relative humidity, vapor pressure deficit) on the daily dynamics of the water potential in foliated (needled) shoots of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and silver birch (*Betula pendula* Roth) trees during the growing season were studied in a fresh bilberry pine forest in the European part of the middle taiga (southern Karelia). Based on the analysis of model data, it was established that the contributions of the leading environmental factors to the formation of the water potential in coniferous and deciduous plants are comparable, and no interspecific differences were found. The similarity of the environmental factors dominance is shown for the two species, namely PAR rate effect dominance in July, relative

air humidity in August, air temperature in September. In June, however, significant differences between the species were revealed in the governing influence of environmental factors on the water exchange in Scots pine (relative air humidity) and silver birch (PAR rate). These differences are supposed to be due to the biological traits of the formation of shoots and leaves (needles) in the coniferous and deciduous plants during the period of intensive growth. At the same time, we observed a somewhat inert response of the water potential in the foliated shoots of woody plants to abrupt changes in abiotic factors during the day, which is due to the mechanism of endogenous regulation of the water exchange. The similarity of the leading abiotic factors and their contributions to the formation of the water potential for coniferous and deciduous woody plants through the growing season suggests that taxonomically different species growing in the same climatic region have similar adaptation mechanisms.

Key words: *Pinus sylvestris* L.; *Betula pendula* Roth; water potential; diurnal rhythm; seasonal dynamics; environmental factors.

Введение

Проблема воздействия изменяющихся климатических условий на растительный покров, его структуру и свойства, а также анализ механизмов обратного влияния растительности на условия окружающей среды являются наиболее актуальными в современных исследованиях [Bonan, 2008; Katul et al., 2012; Fatichi et al., 2015; Ольчев и др., 2017]. В рамках общих проблем глобального изменения климата и устойчивости биосферы одной из важнейших является оценка чувствительности составляющих гидрологического и биохимических циклов в разных регионах к возможным изменениям климата. Хорошим показателем влагообеспеченности фитоценозов служит величина водного потенциала (Ψ) побегов отдельных деревьев, который отражает состояние баланса между поступлением влаги из почвы и потерями влаги в процессе транспирации и зависит от запасов воды в самом растении [Kramer, Boyer, 1995].

Работы по изучению динамики водного потенциала листьев и облиственных побегов разных видов древесных растений проводились многими исследователями [Судницын, Цельникер, 1960; Klepper, 1968; Hellkvist, Parsby, 1976; Hinckley et al., 1978; Кайбияйнен и др., 1981; Whitehead et al., 1981; Кайбияйнен, Сазонова, 1993; Сенькина, 1998; Молчанов, Молчанова, 2000; Vucci et al., 2005; Bhaskar, Ackerly, 2006; Сазонова, Придача, 2015] с целью установления временной вариабельности показателей водообмена, характеристики различных уровней водного дефицита в растении, а также выявления эндогенных и экзогенных факторов, влияющих на основные характеристики этих ритмов. Попытки подобрать приемлемый вид функциональной зависимости биоритма водного потенциала от времени суток большей частью приводили к синусоиде, которая впол-

не адекватно представляла периодическую составляющую ритма, однако на определенных временных отрезках давала серьезные погрешности для абсолютных значений аппроксимируемого показателя и не достигала желаемой точности воспроизведения суточного тренда, полученного в ходе наблюдения [Кайбияйнен, 1984; Сазонова и др., 2011; Тихова и др., 2015]. Вместе с тем при исследовании комплексного влияния абиотических факторов, в частности интенсивности ФАР, относительной влажности и температуры воздуха, на формирование величины Ψ недостаточно четко рассматривался вопрос о приоритете и величине вклада каждого из них в конечное значение исследуемого показателя на протяжении всего вегетационного периода.

Цель нашей работы – комплексное исследование влияния интенсивности ФАР, температуры и относительной влажности воздуха, дефицита упругости водяного пара на водный потенциал побегов хвойного (*Pinus sylvestris* L.) и лиственного (*Betula pendula* Roth) растений в условиях сосняка черничного свежего и оценка вклада каждого фактора внешней среды в формирование величины Ψ исследуемых древесных растений в вегетационной динамике.

Материалы и методы

Исследования проводили в сосновом древостое европейской части средней тайги в Южной Карелии (62°13'N, 34°10'E). Пробная площадь была заложена в сосняке черничном свежем, относящемся к II–III классу бонитета. Почва – песчаный иллювиально-гумусово-железистый подзол. Основная масса корней сосредоточена на глубине 2–20 см. Грунтовые воды – на глубине 1,5–1,7 м [Сазонова и др., 2011].

Объектами исследования были деревья сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и бере-

зы повислой (*Betula pendula* Roth) одного класса возраста – 35–45 лет, высотой до 15 м, без внешних признаков угнетения. Отбор образцов проводили с интервалом в 1 час в течение суток с июня по сентябрь в дни с разными погодными условиями. В каждый срок вели наблюдения для шести деревьев; с каждого дерева отбирали по три побега со средней части кроны. Исследования осуществляли в течение вегетационных периодов 2007–2017 гг. Объем выборки в среднем за вегетацию для каждого дерева сосны и березы составил 505 и 507 измерений величины Ψ соответственно. Измерения величины Ψ охвоенных (облиственных) побегов сосны и березы проводили с помощью камеры давления Plant Moisture Vessel SKPM 1400 (Skye Instruments Ltd., Великобритания). Для определения интенсивности света, температуры и относительной влажности воздуха, дефицита упругости водяного пара использовали стандартные метеорологические приборы, систему Li-Cor 6400XT (Li-Cor Inc., США) и автономную систему непрерывной регистрации температуры и относительной влажности TPB-2 («Инженерные технологии», Россия). Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Для обработки результатов применяли методы описательной статистики [Гланц, 1999], а также процедуру множественной линейной регрессии [Glantz, Slinker, 2003]. Анализ взаимосвязей между факторами среды производили с помощью коэффициентов корреляции Пирсона. Проверку гипотез на статистическую достоверность различий и значимость рассчитанных статистик осуществляли при 5%-м уровне значимости. Статистическую обработку и анализ данных проводили с использованием программ Microsoft Excel и Statistica v. 10.

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование вегетационной динамики суточного ритма водного потенциала охвоенных (облиственных) побегов сосны и березы показало, что суточный ритм исследуемого показателя обоих видов может быть аппроксимирован синусоидой только с большой ошибкой. Анализ суточных трендов водного потенциала свидетельствует о его ритмичной смене и некоторой паузе, которая наступает в ночные часы. Такой тренд не укладывается в стандартную колебательную модель и предполагает применение метода сплайнов или другого сложного сочетания различных функций

в разное время суток для более точного описания суточной динамики величины Ψ . В этой связи мы отказались от косинор-анализа, который применяли ранее для моделирования изменения величины Ψ в течение суток [Тихова и др., 2015]. При разработке нами множественной регрессионной модели динамики водного потенциала охвоенных (облиственных) побегов сосны и березы в качестве переменной отклика был принят водный потенциал, множество предикторов составили абиотические факторы среды, значения которых регистрировали одновременно со значениями Ψ обоих видов, в частности, температура воздуха (T), относительная влажность воздуха (RH), дефицит упругости водяного пара (VPD) и интенсивность ФАР (PAR). Следует отметить, что в содержательном смысле данная модель не претендует на описание влияния абиотических факторов на величину Ψ , поскольку она не позволяет вычленить вклад эндогенного компонента суточного ритма в изменение водного потенциала. Вместе с тем такая постановка задачи позволяет выявить ассоциативную связь исследуемого показателя с комплексом абиотических факторов в целом и вклад каждого из них в эту ассоциацию.

Предварительно проведенный корреляционный анализ регистрируемых факторов внешней среды (расчет парных коэффициентов корреляции Пирсона) показал, что структура взаимосвязей этих факторов различна в разные сроки вегетационного периода. Этот факт позволил нам разделить весь период наблюдений на календарные месяцы и получить кросс-корреляционные матрицы (табл. 1). Парные коэффициенты корреляции, рассчитанные по данным, полученным в июне, июле и августе, указывают на чрезвычайно сильную линейную взаимосвязь между VPD – RH , а также VPD – T , что требует проверки значимости коэффициентов регрессионного уравнения.

По экспериментальным данным методом множественного регрессионного анализа были получены математические модели взаимосвязи водного потенциала охвоенных (облиственных) побегов сосны и березы с факторами внешней среды:

$$\Psi = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot RH + a_3 \cdot VPD + a_4 \cdot PAR,$$

где Ψ – водный потенциал (МПа); T – температура воздуха ($^{\circ}\text{C}$); RH – относительная влажность воздуха (%); VPD – дефицит упругости водяного пара (кПа); PAR – интенсивность ФАР (мкмоль/ $\text{м}^2\cdot\text{с}$); a_0 – a_4 – коэффициенты модели. Значения коэффициентов регрессионного уравнения и другие статистические парамет-

Таблица 1. Матрица корреляций между факторами среды в вегетационной динамике

Table 1. Correlation matrix between environmental factors in vegetation dynamics

Факторы Factors	Июнь June				Июль July			
	<i>T</i>	<i>RH</i>	<i>VPD</i>	<i>PAR</i>	<i>T</i>	<i>RH</i>	<i>VPD</i>	<i>PAR</i>
<i>T</i>	1	-0,68*	0,83*	0,42*	1	-0,10	0,56*	0,30*
<i>RH</i>		1	-0,80*	-0,61*		1	-0,96*	-0,65*
<i>VPD</i>			1	0,49*			1	0,62*
<i>PAR</i>				1				1
Факторы Factors	Август August				Сентябрь September			
	<i>T</i>	<i>RH</i>	<i>VPD</i>	<i>PAR</i>	<i>T</i>	<i>RH</i>	<i>VPD</i>	<i>PAR</i>
<i>T</i>	1	-0,84*	0,85*	0,23	1	-0,10	0,59*	0,30*
<i>RH</i>		1	-0,98*	-0,44*		1	-0,60*	-0,18
<i>VPD</i>			1	0,34*			1	0,55*
<i>PAR</i>				1				1

Примечание. Здесь и далее: *T* – температура воздуха, *RH* – относительная влажность воздуха, *VPD* – дефицит упругости водяного пара, *PAR* – интенсивность ФАР; * $p < 0,05$.

Note. Here and hereinafter: *T* – air temperature, *RH* – relative air humidity, *VPD* – vapor pressure deficit, *PAR* – the rate of photosynthetically active radiation; * $p < 0,05$.

Таблица 2. Коэффициенты многомерной линейной регрессионной модели взаимосвязи водного потенциала охвоенных (облиственных) побегов сосны (над чертой) и березы (под чертой) с факторами внешней среды в вегетационной динамике

Table 2. Coefficients of multidimensional linear regression model of interrelation between water potential in foliated (needled) shoots of Scots pine (above the line) and silver birch (below the line) and environmental factors in vegetation dynamics

Месяц Month	a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	R^2
Июнь June	$\frac{-1,631^{***}}{-0,664^{***}}$	$\frac{0,017^{***}}{ns}$	$\frac{0,011^{***}}{0,004^{***}}$	$\frac{ns}{ns}$	$\frac{-0,375^{***}}{-0,330^{***}}$	$\frac{0,89^*}{0,87^*}$
Июль July	$\frac{-0,604^{***}}{-0,115^{***}}$	$\frac{-0,012^{***}}{-0,009^{***}}$	$\frac{0,004^{***}}{ns}$	$\frac{ns}{-0,017^{**}}$	$\frac{-0,349^{***}}{-0,384^{***}}$	$\frac{0,85^*}{0,86^*}$
Август August	$\frac{-1,951^{***}}{-2,664^{***}}$	$\frac{0,017^{***}}{ns}$	$\frac{0,014^{***}}{0,025^{***}}$	$\frac{ns}{0,067^{**}}$	$\frac{-0,305^{***}}{-0,287^{***}}$	$\frac{0,82^*}{0,81^*}$
Сентябрь September	$\frac{-1,130^{***}}{-0,880^{***}}$	$\frac{0,017^{***}}{0,017^{***}}$	$\frac{0,006^{***}}{0,005^{***}}$	$\frac{-0,063^{***}}{-0,067^{***}}$	$\frac{-0,231^{***}}{-0,309^{***}}$	$\frac{0,79^*}{0,74^*}$

Примечание. Здесь и далее: R^2 – коэффициент детерминации; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; *ns* – не значимо ($p > 0,05$).

Note. Here and hereinafter: R^2 – coefficient of determination; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; *ns* – not significant ($p > 0,05$).

ры модели для сосны и березы, рассчитанные отдельно для каждого месяца, представлены в табл. 2.

Высокие коэффициенты детерминации для каждой модели как хвойного, так и лиственного растения указывают на достаточную степень согласия модели с имеющимися выборочными данными. Вместе с тем в моделях для сосны, рассчитанных по данным июня, июля и августа, регрессионные коэффициенты для фактора *VPD* были незначимыми ($p > 0,05$). Это позволило нам исключить фактор *VPD* из комплекса предикторов регрессионной модели для хвойного растения для летних месяцев (июнь–август). Однако для расчета параметров модели по данным, собранным в сентябре, были ос-

тавлены все четыре фактора. В то же время для регрессионной модели лиственного растения было показано, что *VPD* и *RH* являются взаимозаменяемыми предикторами Ψ только для трендов июня и июля, причем в июле именно фактор *VPD* вносит статистически значимый ($p < 0,01$) вклад в формирование отклика водного потенциала, а не *RH* ($p > 0,05$). При этом в регрессионной модели, рассчитанной по данным Ψ побегов березы для августа и сентября, в качестве предикторов были оставлены оба фактора, поскольку удаление одного из них существенно снижало коэффициент детерминации итоговой регрессионной формулы.

Также для хвойного и лиственного растений нами были рассчитаны стандартизованные ко-

Таблица 3. Стандартизованные коэффициенты многомерной линейной регрессионной модели взаимосвязи водного потенциала охвоенных (облиственных) побегов сосны (над чертой) и березы (под чертой) с факторами внешней среды в вегетационной динамике

Table 3. Standardized coefficients of multidimensional linear regression model of interrelation between water potential in foliated (needled) shoots of Scots pine (above the line) and silver birch (below the line) and environmental factors in vegetation dynamics

Месяц Month	<i>T</i>	<i>RH</i>	<i>VPD</i>	<i>PAR</i>
Июнь June	$\frac{0,357^*}{ns}$	$\frac{0,688^{**}}{0,364^*}$	$\frac{ns}{ns}$	$\frac{-0,564^{**}}{-0,662^{**}}$
Июль July	$\frac{-0,222^*}{-0,176^*}$	$\frac{0,269^*}{ns}$	$\frac{ns}{-0,242^*}$	$\frac{-0,575^{**}}{-0,637^{**}}$
Август August	$\frac{0,340^*}{ns}$	$\frac{0,937^{**}}{1,411^{**}}$	$\frac{ns}{0,727^{**}}$	$\frac{-0,353^*}{-0,287^*}$
Сентябрь September	$\frac{0,614^{**}}{0,575^{**}}$	$\frac{0,364^*}{0,286^*}$	$\frac{-0,503^{**}}{-0,502^{**}}$	$\frac{-0,321^*}{-0,397^*}$

Таблица 4. Сравнительная оценка вкладов доминирующих факторов в формирование величины Ψ хвойного и лиственного растений в вегетационной динамике

Table 4. Comparative evaluation of the dominant factors contributions to Ψ formation in coniferous and deciduous plants in vegetation dynamics

Месяц Month	Сосна Scots pine	Береза silver birch
Июнь June	<i>RH</i> : 0,688 / 0,011	<i>PAR</i> : -0,662 / -0,330
Июль July	<i>PAR</i> : -0,575 / -0,349	<i>PAR</i> : -0,637 / -0,384
Август August	<i>RH</i> : 0,937 / 0,014	<i>RH</i> : 1,411 / 0,025
Сентябрь September	<i>T</i> : 0,614 / 0,0166	<i>T</i> : 0,575 / 0,0168

Примечание. Приведены значения абсолютных (справа) и стандартизованных (слева) коэффициентов регрессионной модели.

Note. The absolute (right) and standardized (left) coefficients of the regression model are given.

эффициенты регрессионной модели (табл. 3), основное преимущество которых заключается в возможности сравнения их друг с другом и последующем ранжировании соответствующих им факторов по силе воздействия на исследуемую переменную. Полученные результаты показали, что для сосны в июне и августе из всего комплекса рассмотренных нами абиотических факторов наибольший вклад в формирование величины Ψ вносит фактор *RH*, в июле доминирует фактор *PAR*, а в сентябре – *T*. На втором месте по силе связи с динамикой водного потенциала охвоенных побегов сосны стоит фактор *PAR* в июне и августе, а в июле и сентябре – факторы *RH* и *VPD* соответственно. В то же время для березы в июне и июле ведущую роль в ассоциации факторов среды с водным потенциалом играет фактор *PAR*, вклад которого в величину Ψ на единицу измерения двукратно превышает вклады других внешних параметров в этот период. Однако в последующие месяцы его значение в ассоциации факторов среды и водного потенциала значительно снижается,

уступая первенство факторам *RH* и *T* в августе и сентябре соответственно.

Следует отметить, что вклады ведущих факторов среды в формирование величины Ψ как для хвойного, так и для лиственного растения сопоставимы по численным значениям, их межвидовые различия по результатам анализа не обнаружены (табл. 4). Так, например, в июле фактор *PAR* является наиболее значимым параметром для обоих видов и определяет статистически равный вклад в формирование водного дефицита растений. Кроме того, для исследуемых видов растений отмечено сходство доминирующих факторов среды, в частности, в июле – *PAR* ($p = 0,27$), в августе – *RH* ($p = 0,05$), в сентябре – *T* ($p = 0,96$). Однако в июне нами были выявлены межвидовые отличия вклада средообразующих факторов в формирование величины Ψ , которые зависели у сосны и березы от *RH* и *PAR* соответственно. Этот факт, вероятно, обусловлен биологическими особенностями хвойного и лиственного растения, в частности разной интенсивностью

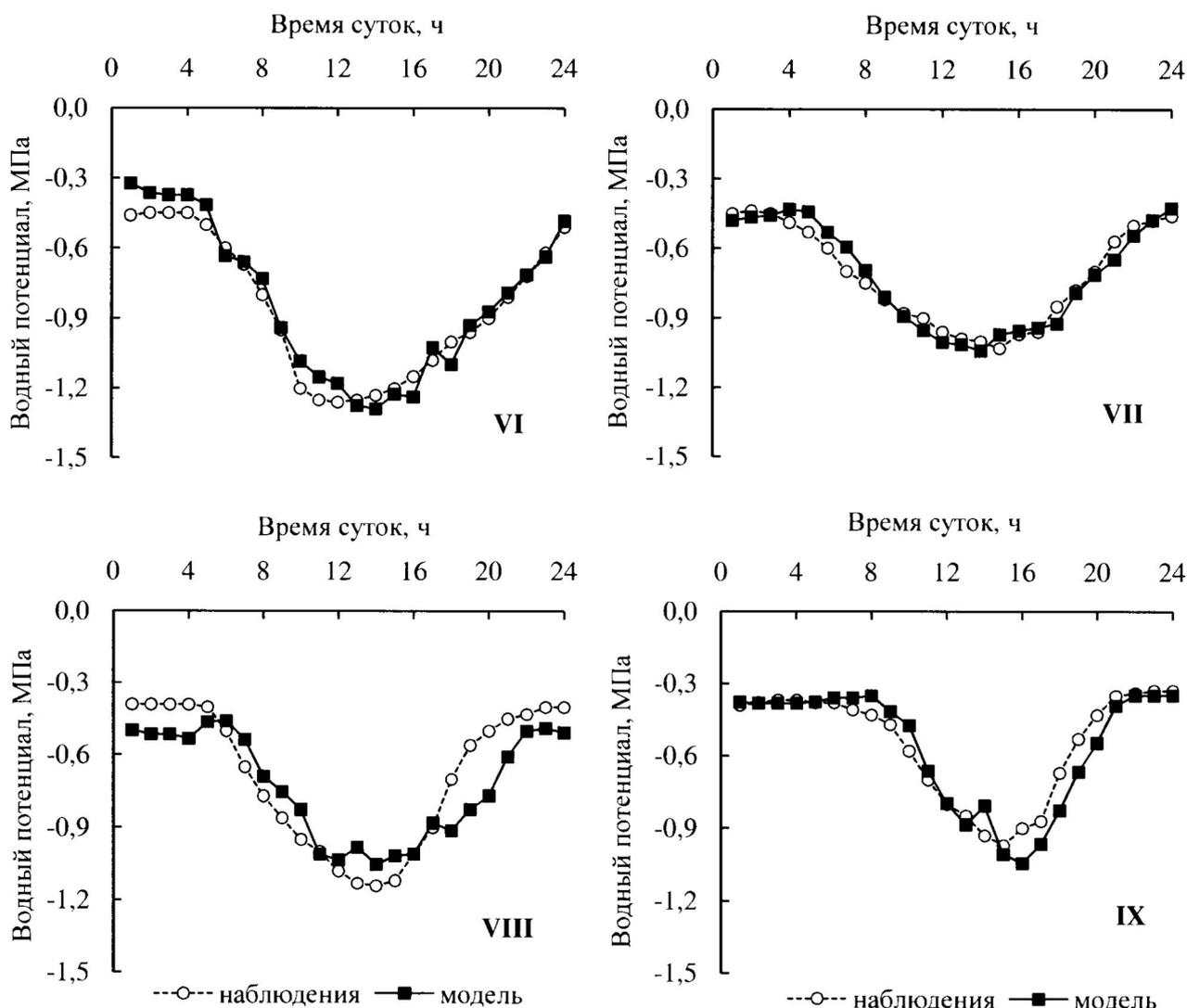


Рис. 1. Тренд суточной динамики Ψ охвоенных побегов сосны обыкновенной и его аппроксимация методом множественной линейной регрессии для разных месяцев: VI – июнь, VII – июль, VIII – август, IX – сентябрь

Fig. 1. The trend of daily Ψ dynamics in needled shoots of Scots pine and its approximation by the method of multiple linear regression for different months: VI – June, VII – July, VIII – August, IX – September

и продолжительностью формирования их побегов и листьев [Кищенко, Вантенкова, 2013, 2014]. Так, у березы распускание листьев происходит по мере роста побегов, тогда как у сосны полное распускание хвои происходит уже после окончания роста побегов. Таким образом, межвидовые различия формирования ассимиляционной, а также транспирирующей поверхности в период интенсивного роста (июнь) обеспечивают существенно различное влияние факторов внешней среды на исследуемый показатель водообмена сосны и березы, тогда как во все последующие месяцы и доминирующий фактор, и его вклад в формирование величины Ψ статистически сопоставимы для хвойного и лиственного растений.

Сопоставление исходных трендов водного потенциала и их модельных аппроксимаций показало, что модельное представление суточной динамики величины Ψ хвойного растения (рис. 1) проявляет большую чувствительность к кратковременным флуктуациям значений факторов среды, чем это демонстрируют исходные тренды. Для лиственного растения также можно отметить достаточно хорошее общее приближение трендов, однако к тонкой настройке механизма управления водным потенциалом березы в зависимости от абиотических факторов предложенная модель недостаточно чувствительна (рис. 2). Анализ ошибок модели суточной динамики величины Ψ охвоенных побегов сосны показал, что их распределе-

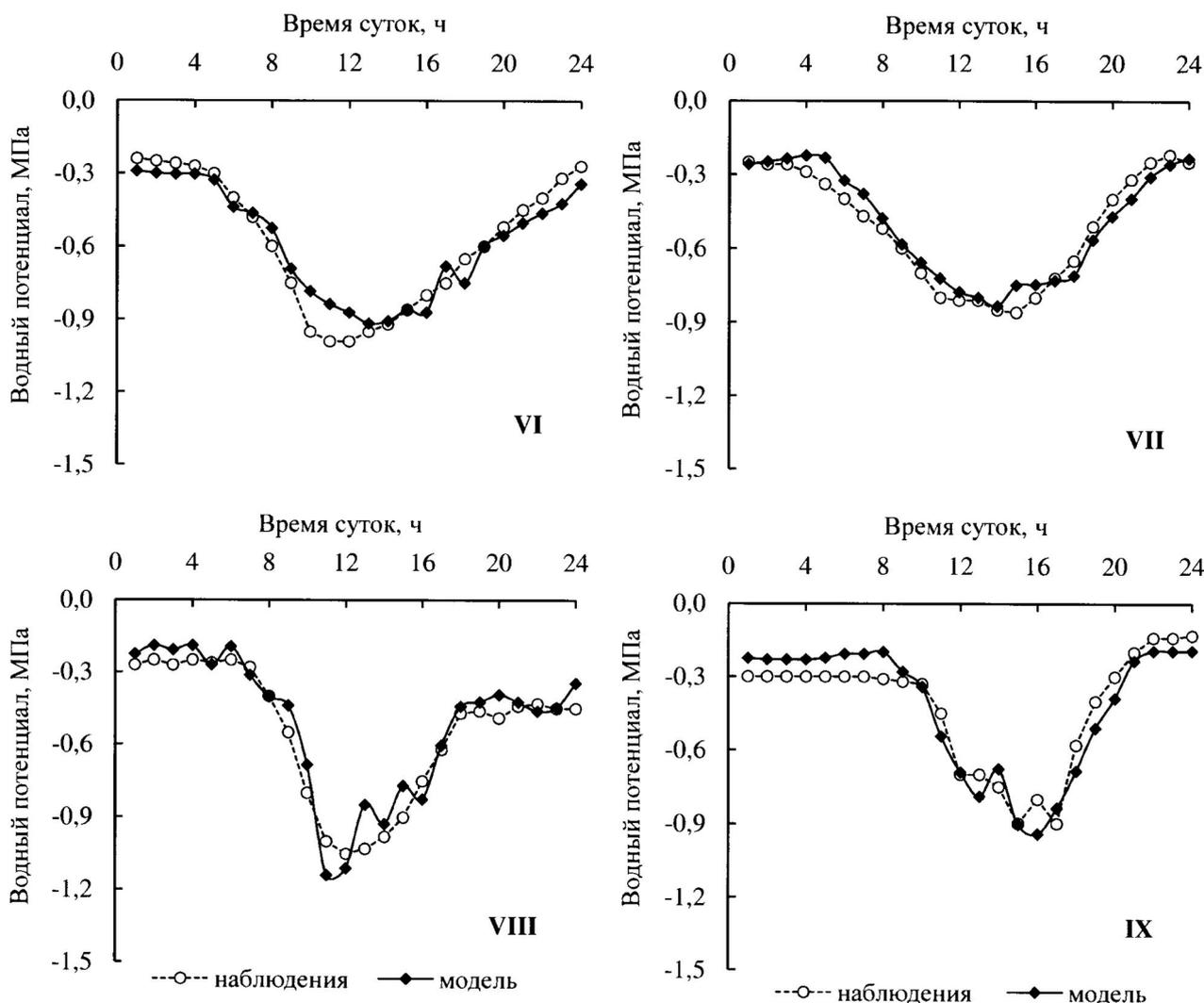


Рис. 2. Тренд суточной динамики Ψ облиственных побегов березы повислой и его аппроксимация методом множественной линейной регрессии для разных месяцев: VI – июнь, VII – июль, VIII – август, IX – сентябрь.

Fig. 2. The trend of daily Ψ dynamics of foliated shoots of silver birch and its approximation by the method of multiple linear regression for different months: VI – June, VII – July, VIII – August, IX – September

ние имеет неслучайный (регулярный) характер: в первой половине суток, приблизительно с 1.00 до 13.00, ошибки имеют положительный знак с пиковыми значениями, приходящимися на поздние утренние часы, тогда как во второй половине суток, после 14.00, ошибки модели имеют отрицательные значения. Этот факт может быть связан с тем, что в первой половине суток предложенная нами регрессионная модель, учитывающая только вышеперечисленные факторы внешней среды, занижает результаты по сравнению с реальными значениями, а в вечерние часы, напротив, их завышает. В отношении модели для березы наблюдается такая же погрешность. Эта регулярность и схожесть ошибок моделей для хвойного и листвен-

ного растений позволяет нам предположить, что модель не учитывает один и тот же фактор, который вносит свой значимый вклад в формирование итогового значения Ψ . При разработке модели мы исключили из рассмотрения фактор времени, так как он нарушал линейность всей математической конструкции. Величина Ψ зависит от переменной времени нелинейно. Попытка аппроксимации этой зависимости с помощью синусоиды [Тихова и др., 2015] также приводила к погрешностям, имеющим регулярный характер на области определения, ограниченной 24 часами. Периодичность зависимости ошибок модели от переменной времени с 24-часовым периодом колебаний позволяет предположить эндогенную составляющую,

которая вносит свой вклад в конечное значение Ψ в каждый конкретный момент времени суток.

Некоторая инертность отклика водного потенциала побегов древесных растений на резкие изменения абиотических факторов в течение суток обусловлена механизмом эндогенной регуляции водного обмена. Так, при определенной величине Ψ начинается устьичное ограничение транспирации, что снижает интенсивность дегидратации водопроводящих путей. Степень и интенсивность такой гидравлической регуляции варьирует среди видов и зависит от размера, структуры и функционального типа растения [Buckley, 2005; Domec et al., 2010; Martín-Gómez et al., 2017]. В ряде исследований критический порог потери влаги также связывают с величиной Ψ , индуцирующего потерю гидравлической проводимости ксилемы ствола хвойных [Brodribb, Cochard, 2009] и лиственных [Urli et al., 2013] древесных растений на 50 и 80 % соответственно. У исследуемого нами хвойного растения ограничение транспирационных расходов влаги посредством закрывания устьиц начинается при значениях Ψ $-1,0...-1,1$ МПа [Сазонова и др., 2005]. При этом снижение оводненности ствола у березы происходит при более высоких значениях Ψ облиственного побега [Сазонова и др., 2015], поскольку диапазон величин Ψ , которому соответствует максимальная скорость водного потока у березы, сдвинут в сторону более высоких значений ($-0,4...-0,6$ МПа) по сравнению с сосной ($-0,6...-0,95$ МПа). В то же время анализ многолетних данных суточной динамики водного потенциала охвоенных (облиственных) побегов хвойного и лиственного видов выявил постоянство диапазонов их предрассветных ($\Psi_{\text{поб. макс}}$) и дневных ($\Psi_{\text{поб. мин}}$) значений, которые составили для сосны $-0,3...-0,7$ и $-0,65...-1,5$ МПа и для березы $-0,1...-0,45$ и $-0,5...-1,6$ МПа соответственно [Сазонова и др., 2015, 2017]. Умеренная реакция на выбросы значений факторов внешней среды и более монотонное по сравнению с модельным изменение функции водного потенциала также могут быть обусловлены накоплением влаги в стволе в ночной период для смягчения колебаний между транспирацией листа и поступлением воды в корень в дневные часы.

Заключение

Проведенное исследование влияния абиотических факторов среды на водообмен хвойного (*Pinus sylvestris* L.) и лиственного (*Betula pendula* Roth) растений позволило оценить вклад интенсивности ФАР, температуры и относительной влажности воздуха, дефицита упругости водя-

ного пара в формирование величины Ψ древесных растений в вегетационной динамике. Предложенные нами модели взаимосвязи водного потенциала охвоенных (облиственных) побегов сосны и березы с факторами внешней среды являются статистически значимыми аппроксимациями наблюдаемых трендов, однако модельное представление проявляет большую чувствительность к резким изменениям факторов внешней среды в течение суток по сравнению с реальным трендом величины Ψ побегов сосны и березы. Периодический неслучайный характер ошибок моделей свидетельствует о наличии неучтенной в данной модели периодически изменяющейся переменной. В дальнейшем с целью усовершенствования предложенной модели необходимо выявить функциональную связь этой переменной с водным потенциалом, что позволит повысить точность аппроксимации и прогностическую ценность модели.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0220-2017-0002) и при финансовой поддержке РФФИ (грант 17-04-01087-а).

Литература

- Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
- Кайбияйнен Л. К. Ритмологические и параметрические аспекты адаптации растений к конкретным условиям среды // Адаптация древесных растений к экстремальным условиям среды. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1984. С. 53–65.
- Кайбияйнен Л. К., Сазонова Т. А. Вариации водных потенциалов в системе «почва-растение-атмосфера» на примере сосны обыкновенной // Лесоведение. 1993. № 3. С. 41–47.
- Кайбияйнен Л. К., Сазонова Т. А., Тихов П. В. Транспирационные потоки в ксилеме сосны и динамика потребления влаги // Лесоведение. 1981. № 2. С. 27–34.
- Кищенко И. Т., Вантенкова И. В. Сезонный рост лиственных лесообразующих видов в таежной зоне России (на примере Карелии). Петрозаводск: ПетрГУ, 2013. 94 с.
- Кищенко И. Т., Вантенкова И. В. Сезонный рост хвойных лесообразующих видов в таежной зоне России (на примере Карелии). Петрозаводск: ПетрГУ, 2014. 163 с.
- Молчанов А. Г., Молчанова Т. Г. Предрассветный водный потенциал листьев дуба как показатель влагообеспеченности растений // Лесоведение. 2000. С. 72–74.
- Ольчев А. В., Авилов В. К., Байбар А. С., Белотелов Н. В., Болондинский В. К., Иванов Д. Г., Кузьмина Е. В., Курбатова Ю. А., Левашова Н. Т.,

Мамкин В. В., Мангура П. А., Молчанов А. Г., Мухартова Ю. В., Никитин М. А., Новенко Е. Ю., Придача В. Б., Ривин Г. С., Розинкина И. А., Сазонова Т. А., Сандлерский Р. Б., Суркова Г. В., Холопцева Е. С. Леса европейской территории России в условиях меняющегося климата. М.: КМК, 2017. 276 с.

Сазонова Т. А., Болондинский В. К., Придача В. Б. Влияние водного дефицита хвои сосны обыкновенной на фотосинтез в условиях достаточного почвенного увлажнения // Лесоведение. 2017. № 4. С. 311–318. doi: 10.7868/S0024114817040076

Сазонова Т. А., Болондинский В. К., Придача В. Б. Эколого-физиологическая характеристика сосны обыкновенной. Петрозаводск: Verso, 2011. 207 с.

Сазонова Т. А., Кайбияйнен Л. К., Колосова С. В. Диагностика водного режима *Pinus sylvestris* (Pinaceae) // Ботанический журнал. 2005. Т. 90, № 7. С. 1012–1022.

Сазонова Т. А., Придача В. Б. Влияние влагообеспеченности песчаных почв на параметры водообмена сосны обыкновенной в Южной Карелии // Лесоведение. 2015. № 6. С. 470–477.

Сазонова Т. А., Софронова И. Н., Новичонок Е. В., Придача В. Б. Водный режим древесных растений в условиях достаточного почвенного увлажнения на северо-западе России // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. № 8–2. С. 299–302.

Сенькина С. Н. Водный обмен хвои деревьев ели разного возраста // Лесоведение. 1998. № 1. С. 60–68.

Судницын И. И., Цельникер Ю. Л. О соотношении давления почвенной влаги и сосущей силы листьев древесных пород // ДАН СССР. 1960. Т. 131. С. 1457–1459.

Тихова Г. П., Придача В. Б., Сазонова Т. А. Исследование динамики водного потенциала растений *Betula pendula* Roth с помощью косинор-анализа // Принципы экологии. 2015. Т. 4, № 3. С. 60–72. doi: 10.15393/j1.art.2015.4321

Bhaskar R., Ackerly D. D. Ecological relevance of minimum seasonal water potentials // *Physiol. Plantarum*. 2006. Vol. 127. P. 353–359. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00718.x

Bonan G. B. Forests and climate change: forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests // *Science*. 2008. Vol. 320. P. 1444–1449. doi: 10.1126/science.1155121

Brodribb T. J., Cochard H. Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers // *Plant Physiol*. 2009. Vol. 149. P. 575–584. doi: 10.1104/pp.108.129783

Bucci S. J., Goldstein G., Meinzer F. C., Franco A. C., Campanello P., Scholz F. G. Mechanisms contributing to seasonal homeostasis of minimum leaf

water potential and predawn disequilibrium between soil and plant water potential in Neotropical savanna trees // *Trees*. 2005. Vol. 19. P. 296–304. doi: 10.1007/s00468-004-0391-2

Buckley T. N. The control of stomata by water balance // *New Phytologist*. 2005. Vol. 168. P. 275–292. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01543.x

Domec J. C., Schäfer K., Oren R., Kim H. S., McCarthy H. R. Variable conductivity and embolism in roots and branches of four contrasting tree species and their impacts on whole-plant hydraulic performance under future atmospheric CO₂ concentration // *Tree Physiology*. 2010. Vol. 30. P. 1001–1015. doi: 10.1093/treephys/tpq054

Fatichi S., Pappas C., Ivanov V. Modeling plant – water interactions: an ecohydrological overview from the cell to the global scale // *WIREs: Water*. 2015. P. 1–42. doi: 10.1002/wat2.1125

Glantz S. A., Slinker B. K. Primer of applied regression and analysis of variance. New York: McGraw-Hill, 2003. P. 162–318.

Hellkvist J., Parsby J. The water relations of *Pinus sylvestris*. III. Diurnal and seasonal patterns of water potential // *Physiol. Plant*. 1976. Vol. 38, no 1. P. 61–68. doi: 10.1111/j.1399-3054.1976.tb04859.x

Hinckley T. M., Lassoie J. P., Running S. W. Temporal and spatial variations in the water status of forest trees // *Forest Science*. 1978. Monog. 20. 72 p.

Katul G. G., Oren R., Manzoni S., Higgins C., Parlange M. B. Evapotranspiration: a process driving mass transport and energy exchange in the soil-plant-atmosphere-climate system // *Rev. Geophys*. 2012. Vol. 50. P. 1–25. doi: 10.1029/2011RG000366

Klepper B. Diurnal pattern of water potential in woody plants // *Plant Physiology*. 1968. Vol. 43, no. 12. P. 1931–1934. doi: 10.1104/pp.43.12.1931

Kramer P. J., Boyer J. S. Water relations of plants and soil. New York: Academic, 1995. 495 p.

Martín-Gómez P., Aguilera M., Pemán J., Gil-Pelegrín E., Ferrio J. P. Contrasting ecophysiological strategies related to drought: the case of a mixed stand of Scots pine (*Pinus sylvestris*) and a submediterranean oak (*Quercus subpyrenaica*) // *Tree Physiology*. 2017. Vol. 37. P. 1478–1492. doi: 10.1093/treephys/tpx101

Urli M., Porté A. J., Cochard H., Guengant Y., Burrett R., Delzon S. Xylem embolism threshold for catastrophic hydraulic failure in angiosperm trees // *Tree Physiology*. 2013. Vol. 33. P. 672–683. doi: 10.1093/treephys/tpx030

Whitehead D., Jarvis P. G., Kozłowski T. T. Coniferous forests and plantations // *Water deficits and plant growth* / Ed. T. T. Kozłowski. New York: Academic Press, 1981. P. 49–152.

Поступила в редакцию 28.05.2018

References

Glantz S. Mediko-biologicheskaya statistika [Biomedical statistics]. Moscow: Praktika, 1999. 459 p.

Kaibiyainen L. K. Ritmologicheskie i parametricheskie aspekty adaptatsii rastenii k konkretnym us-

loviyam sredy [Rhythmological and parametric aspects of plant adaptation to specific environmental conditions]. *Adaptatsiya drevesnykh rastenii k ekstremal'nym usloviyam sredy* [Woody plants adapta-

tion to extreme conditions]. Petrozavodsk, 1984. P. 53–65.

Kaibiyainen L. K., Sazonova T. A. Variatsii vodnykh potentsialov v sisteme «pochva-rastenie-atmosfera» na primere sosny obyknovnoy [Variation of water potential in a soil – plant – water system by the example of the Scots pine]. *Lesovedenie [Russ. J. Forest Sci.]*. 1993. No. 3. P. 41–47.

Kaibiyainen L. K., Sazonova T. A., Tikhov P. V. Transpiratsionnye potoki v ksileme sosny i dinamika potrebleniya vlagi [Transpiration flows in Scots pine xylem and dynamics of moisture uptake]. *Lesovedenie [Russ. J. Forest Sci.]*. 1981. No. 2. P. 27–34.

Kishchenko I. T., Vantenkova I. V. Sezonnii rost listvennykh lesoobrazuyushchikh vidov v taezhnoi zone Rossii (na primere Karelii) [Seasonal growth of deciduous forest-forming species in the taiga zone of Russia (by the example of Karelia)]. Petrozavodsk: Izd-vo PetrGU, 2013. 94 p.

Kishchenko I. T., Vantenkova I. V. Sezonnii rost khvoynykh lesoobrazuyushchikh vidov v taezhnoi zone Rossii (na primere Karelii) [Seasonal growth of coniferous forest-forming species in the taiga zone of Russia (by the example of Karelia)]. Petrozavodsk: Izd-vo PetrGU, 2014. 163 p.

Molchanov A. G., Molchanova T. G. Predrassvetnyi vodnyi potentsial list'ev duba kak pokazatel' vlagobespechennosti rastenii [Pre-dawn water potential of an oak leaves as an indicator of plants moisture availability]. *Lesovedenie [Russ. J. Forest Sci.]*. 2000. No. 2. P. 72–74.

Ol'chev A. V., Avilov V. K., Baibar A. S., Belotelov N. V., Bolondinskii V. K., Ivanov D. G., Kuz'mina E. V., Kurbatova Y. A., Levashova N. T., Mamkin V. V., Mangura P. A., Molchanov A. G., Mukhartova Y. V., Nikitin M. A., Novenko E. Y., Pridacha V. B., Rivin G. S., Rozinkina I. A., Sazonova T. A., Sandler'skii R. B., Surkova G. V., Holoitseva E. S. Lesa evropeiskoi territorii Rossii v usloviyakh menyaushchegosya klimata [Forests of European Russia under climate changes]. Moscow: KMK, 2017. 276 p.

Sazonova T. A., Bolondinskii V. K., Pridacha V. B. Ekologo-fiziologicheskaya kharakteristika sosny obyknovnoy [Eco-physiological characteristics of the Scots pine]. Petrozavodsk: Verso, 2011. 207 p.

Sazonova T. A., Bolondinskii V. K., Pridacha V. B. Vliyanie vodnogo defitsita khvoi sosny obyknovnoy na fotosintez v usloviyakh dostatochnogo pochvennogo uvlazhneniya [The effect of water deficit in needles on photosynthesis of the Scots pine under normal soil moistening]. *Lesovedenie [Russ. J. Forest Sci.]*. 2017. No. 4. P. 311–318. doi: 10.7868/S0024114817040076

Sazonova T. A., Kaibiyainen L. K., Kolosova S. V. Diagnostika vodnogo rezhima *Pinus sylvestris* (Pinaceae) [Diagnostics of water regime of *Pinus sylvestris* (Pinaceae)]. *Bot. zhurn.* 2005. Vol. 90, no. 7. P. 1012–1022.

Sazonova T. A., Pridacha V. B. Vliyanie vlagobespechennosti peschanykh pochv na parametry vodoobmena sosny obyknovnoy v Yuzhnoi Karelii [The effects of moisture availability of sandy soils on water exchange of Scots pine in Southern Karelia]. *Lesovedenie [Russ. J. Forest Sci.]*. 2015. No. 6. P. 470–477.

Sazonova T. A., Sofronova I. N., Novichonok E. V., Pridacha V. B. Vodnyi rezhim drevesnykh rastenii v us-

loviyakh dostatochnogo pochvennogo uvlazhneniya na severo-zapade Rossii [Water regime of woody plants under sufficient soil moisture conditions in northwest Russia]. *Mezhd. zhurn. priklad. i fund. issled.* [Int. J. Appl. and Fund. Res.]. 2015. No. 8. P. 299–302.

Sen'kina S. N. Vodnyi obmen khvoi derev'ev eli raznogo vozrasta [Water exchange of needles in different-aged spruce trees]. *Lesovedenie [Russ. J. Forest Sci.]*. 1998. No. 1. P. 60–68.

Sudnitsyn I. I., Tsel'niker Y. L. O sootnoshenii davleniya pochvennoi vlagi i sosushchei sily list'ev drevesnykh porod [On the ratio between the pressure of soil moisture and the suction force of woody plants leaves]. *DAN SSSR*. 1960. Vol. 131. P. 1457–1459.

Tikhova G. P., Pridacha V. B., Sazonova T. A. Issledovanie dinamiki vodnogo potentsiala rastenii *Betula pendula* Roth s pomoshch'yu kosinor-analiza [Study of the water potential dynamics in *Betula pendula* Roth trees using cosinor analysis]. *Printsipy ekol.* [Principles of Ecol.]. 2015. Vol. 4, no. 3. P. 60–72. doi: 10.15393/j1.art.2015.4321

Bhaskar R., Ackerly D. D. Ecological relevance of minimum seasonal water potentials. *Physiol. Plantarum*. 2006. Vol. 127. P. 353–359. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00718.x

Bonan G. B. Forests and climate change: forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. *Science*. 2008. Vol. 320. P. 1444–1449. doi: 10.1126/science.1155121

Brodribb T. J., Cochard H. Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiol.* 2009. Vol. 149. P. 575–584. doi: 10.1104/pp.108.129783

Bucci S. J., Goldstein G., Meinzer F. C., Franco A. C., Campanello P., Scholz F. G. Mechanisms contributing to seasonal homeostasis of minimum leaf water potential and predawn disequilibrium between soil and plant water potential in Neotropical savanna trees. *Trees*. 2005. Vol. 19. P. 296–304. doi: 10.1007/s00468-004-0391-2

Buckley T. N. The control of stomata by water balance. *New Phytologist*. 2005. Vol. 168. P. 275–292. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01543.x

Domec J. C., Schäfer K., Oren R., Kim H. S., McCarthy H. R. Variable conductivity and embolism in roots and branches of four contrasting tree species and their impacts on whole-plant hydraulic performance under future atmospheric CO₂ concentration. *Tree Physiology*. 2010. Vol. 30. P. 1001–1015. doi: 10.1093/treephys/tpq054

Fatichi S., Pappas C., Ivanov V. Modeling plant – water interactions: an ecohydrological overview from the cell to the global scale. *WIREs: Water*. 2015. P. 1–42. doi: 10.1002/wat2.1125

Glantz S. A., Slinker B. K. Primer of applied regression and analysis of variance. New York: McGraw-Hill, 2003. P. 162–318.

Hellkvist J., Parsby J. The water relations of *Pinus sylvestris*. III. Diurnal and seasonal patterns of water potential. *Physiol. Plant*. 1976. Vol. 38, no. 1. P. 61–68. doi: 10.1111/j.1399-3054.1976.tb04859.x

Hinckley T. M., Lassoie J. P., Running S. W. Temporal and spatial variations in the water status of forest trees. *Forest Science*. 1978. Monogr. 20. 72 p.

Katul G. G., Oren R., Manzoni S., Higgins C., Parlange M. B. Evapotranspiration: a process driving mass transport and energy exchange in the soil-plant-atmosphere-climate system. *Rev. Geophys.* 2012. Vol. 50. P. 1–25. doi: 10.1029/2011RG000366

Klepper B. Diurnal pattern of water potential in woody plants. *Plant Physiology.* 1968. Vol. 43, no. 12. P. 1931–1934. doi: 10.1104/pp.43.12.1931

Kramer P. J., Boyer J. S. Water relations of plants and soil. New York: Academic, 1995. 495 p.

Martín-Gómez P., Aguilera M., Pemán J., Gil-Pelegrín E., Ferrio J. P. Contrasting ecophysiological strategies related to drought: the case of a mixed stand

of Scots pine (*Pinus sylvestris*) and a submediterranean oak (*Quercus subpyrenaica*). *Tree Physiology.* 2017. Vol. 37. P. 1478–1492. doi: 10.1093/treephys/tpx101

Urli M., Porté A. J., Cochard H., Guengant Y., Burlett R., Delzon S. Xylem embolism threshold for catastrophic hydraulic failure in angiosperm trees. *Tree Physiology.* 2013. Vol. 33. P. 672–683. doi: 10.1093/treephys/tpt030

Whitehead D., Jarvis P. G., Kozłowski T. T. Coniferous forests and plantations. *Water deficits and plant growth.* New York: Academic Press, 1981. P. 49–152.

Received May 28, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Придача Владислава Борисовна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт леса КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: pridacha@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

Тихова Галина Петровна

ведущий математик
Институт леса КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: tikhovag@gmail.ru
тел.: (8142) 768160

Сазонова Татьяна Аркадьевна

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт леса КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: sazonova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

CONTRIBUTORS:

Pridacha, Vladislava

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

Tikhova, Galina

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

Sazonova, Tatiana

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

УДК 577.112.083; 576.89

СРАВНЕНИЕ ПРОФИЛЯ БЕЛКОВ ПЛЕРОЦЕРКОИДОВ ЦЕСТОДЫ *TRIAENOPHORUS NODULOSUS* ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ХОЗЯЕВ

А. А. Кочнева¹, Е. В. Борвинская^{1,2}, Д. С. Бедулина², И. В. Суховская¹

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

² НИИ биологии Иркутского государственного университета, Россия

Исследован спектр белков паразитических цестод *Triaenophorus nodulosus* (стадия плероцеркоида), извлеченных из печени разных видов рыб: окуня *Perca fluviatilis* L., ерша *Gymnocephalus cernuus* L. и налима *Lota lota* L. При сравнении белковых экстрактов после разделения методом двумерного электрофореза были выявлены 18 белков, концентрация которых статистически значимо различалась у личинок из разных видов рыб. С помощью масс-спектрометрических методов (MALDI-TOF/TOF, LC-MS) из них удалось идентифицировать четыре белка: фермент углеводного обмена триозофосфатизомеразу, компоненты микротрубочек субъединицы тубулина α и β и сигнальную молекулу G-белок. Повышенное содержание компонентов сигнального пути G-белковой регуляции цитоскелета и клеточной морфологии (тубулинов и G-белка) у плероцеркоидов из окуня по сравнению с плероцеркоидами из налима может свидетельствовать о более динамичном цитоскелете, более активных процессах пролиферации и дифференцировки клеток и, возможно, большей степени зрелости личинок из этого вида рыб. Более высокий уровень экспрессии ключевого фермента гликолиза и передачи сигнала триозофосфатизомеразы у плероцеркоидов окуня по сравнению с плероцеркоидами из налима указывает на большую метаболическую активность в тканях личинок из окуня. Полученные результаты свидетельствуют, что среда обитания оказывает влияние на содержание некоторых белков плероцеркоидов *T. nodulosus*.

Ключевые слова: протеомика; гельминты; *Triaenophorus*; Cestoda; промежуточные хозяева.

A. A. Kochneva, E. V. Borvinskaya, D. S. Bedulina, I. V. Sukhovskaya. A COMPARISON OF THE PROTEIN PROFILE OF *TRIAENOPHORUS NODULOSUS* PLEROCERCIDS FROM DIFFERENT INTERMEDIATE HOSTS

The spectrum of proteins was studied in plerocercoids of parasitic cestodes *Triaenophorus nodulosus* collected from the liver of different species of fish: perch *Perca fluviatilis* L., ruffe *Gymnocephalus cernuus* L. and burbot *Lota lota* L. A comparison of protein extracts separated by 2D electrophoresis revealed 18 proteins whose concentrations differed among larvae of different fish species. Of these, 4 proteins were identified by using mass-spectrometric methods (MALDI-TOF/TOF, LC-MS): a carbohydrate metabolism enzyme triosephosphate isomerase, the proteins of microtubules tubulin α and β , and the G-protein signaling molecule. The elevated content of components of the G-protein pathway of the cytoskeleton and cell morphology regulation (tubulin and G-protein) in plerocer-

coids from perch in comparison with plerocercoids from burbot indicate a more dynamic cytoskeleton, increased cell proliferation and differentiation processes, and possibly more mature larvae in the former species. A higher level of expression of the key enzyme of glycolysis and signal transmission in plerocercoids from perch compared to plerocercoids from burbot indicates a greater metabolic activity in larvae from perch. The obtained results indicate that the expression of some proteins in *T. nodulosus* larvae is influenced by the habitat.

Key words: proteomics; helminths; *Triaenophorus*; Cestoda; intermediate hosts.

Введение

Ленточные черви (Cestoda) – широко распространенные и высокоспециализированные облигатные паразиты наземных и водных животных. Это одна из крупнейших и древнейших групп паразитических организмов на Земле, и весьма успешная, так как представители этого класса освоили в качестве среды обитания ткани и органы самых разнообразных животных. Их окончательными хозяевами главным образом являются различные позвоночные животные (в т. ч. человек), промежуточными – позвоночные и беспозвоночные организмы.

Жизненный цикл у ленточных червей сложный и включает последовательное заражение паразитом нескольких видов хозяев, зачастую очень далеких в систематическом отношении. Новый хозяин может сильно отличаться от предыдущего по образу жизни, составу внутренней среды, строению тела, а также по органу локализации паразита. Таким образом, для цестод характерна большая экологическая пластичность, в основе которой лежит способность паразитов при переходе на новый этап развития включать и выключать разные функциональные части генома, запуская соответствующие адаптивные биохимические, физиологические и морфологические изменения [Жигилева, 2017].

Кроме того, многие гельминты отличаются полигостальностью, то есть способностью на одной стадии жизненного цикла паразитировать на нескольких видах хозяев. Это свойство способствует устойчивости вида, так как позволяет паразитам выживать при сокращении численности одного из видов хозяев и расширять ареал обитания. При этом на разных этапах развития червя избирательность в отношении выбора хозяина может быть разной. Так, например, объекты данного исследования цестоды *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781) на стадии личинки – корацидия – могут заражать более 19 видов планктонных рачков отрядов *Cyclopoida* и *Calanoida*, на стадии плероцеркоида инвазируют рыб из 6 отрядов и 18 семейств (*Percidae*, *Gadidae*, *Esocidae*, *Salmon-*

idae, *Osmoridae*, *Thymallidae*, *Cottidae*, *Cyprinidae* и др.), тогда как гермафродитное половозрелое поколение паразитирует почти исключительно в кишечнике щук *Esox* sp. [Куперман, 1973; Kuchta et al., 2007].

Несмотря на то что хозяева, заражаемые паразитом в конкретном периоде онтогенеза, обычно близки филогенетически и экологически, их внутренняя среда может существенно различаться и быть неодинаково благоприятной для развития гельминта. Эти вариации включают в себя разную интенсивность иммунного ответа на инвазию, разную метаболическую активность тканей [Крылов и др., 1993] и разный химический состав внутренней среды (доступность питательных веществ, наличие регуляторных и сигнальных молекул) и т. д. В результате, как было показано в экспериментальных условиях, один и тот же вид паразита с разной эффективностью заражает разные виды хозяев [Куперман, 1973]. В свою очередь, особи паразитов, заселившие разные виды, могут сильно отличаться друг от друга, вплоть до приобретения специфических морфологических признаков [Куперман, 1973; Гиценко, 1995; Аникиева, 1995, 1998; Аникиева, Доровских, 2009; Аникиева и др., 2015]. Таким образом, способность к полигостальности означает высокий уровень приспособительной изменчивости вида, то есть подразумевает наличие у паразита способности к существенным физиологическим и биохимическим перестройкам при адаптации к среде обитания.

В первую очередь подобные специфические изменения происходят на уровне профиля белков (протеома), так как именно белки реализуют генетически заданные программы и под действием факторов среды формируют фенотип особей. Поэтому сравнительный анализ протеомов гельминтов в зависимости от условий среды обитания является перспективным подходом для объяснения различной патогенности паразитов и их неодинаковой способности заражать разные виды хозяев.

В данной работе был исследован спектр белков личинок *T. nodulosus* (стадия плероцеркоида), извлеченных из печени разных видов

рыб: окуня *Perca fluviatilis*, ерша *Gymnocephalus cernuus* и налима *Lota lota*. Целью работы было выявление белков, содержание которых различается у червей, заразивших разных хозяев. Для этого проведено разделение экстрактов растворимого белка плероцеркоидов *T. nodulosus* методом двумерного электрофореза, сделан сравнительный анализ полученных электрофореграмм и масс-спектрометрическими методами осуществлена частичная идентификация белков гельминта.

Материалы и методы

Сбор и хранение образцов

Плероцеркоиды гельминтов были собраны из рыб, выловленных из водоемов Республики Карелия: в сентябре 2015 г. в Ладожском озере (окунь *Perca fluviatilis*, ерш *Gymnocephalus cernuus*); в феврале-марте 2016 г. в Онежском озере (налим *Lota lota*). Капсулы с плероцеркоидами извлекали после вскрытия из печени рыб. Затем капсулу надрезали хирургическими ножницами и вынимали личинку. Червя промывали в физиологическом растворе и осматривали под микроскопом. Живых, активно двигающихся личинок с хорошо различимым головным отделом (сколексом) отбирали и замораживали в жидком азоте до анализа.

Выделение и очистка растворимых белков *T. nodulosus*

Замороженных гельминтов растирали пес­тиком в ступке с жидким азотом с добавлением 0,1 М трис-НСl буфера, рН 7,6; коктейля ингибиторов протеаз (Protease inhibitor cocktail, Amresco) и фенилметансульфонилфторида (Sigma) до состояния порошка. После оттаивания и центрифугирования (7000 г при 3–4 °С, 15 мин) водорастворимую фракцию (супернатант) переносили в чистые пробирки, из которых отбирали аликвоты по 5 мкл для определения содержания белка в пробе [Bradford, 1976]. Белок из оставшегося супернатанта осаждали трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация 10 %). Затем осадок промывали ледяным 80% этанолом и двумя объемами холодного ацетона. После удаления ацетона высушенные осадки хранили до анализа при температуре –80 °С.

Разделение белков *T. nodulosus*

В день анализа очищенный белок растворяли в буфере, содержащем 8 М мочевины,

2% Triton X-100, 0,05 М дитиотриетол, 0,5% амфолиты с диапазоном рН 3,5–10 (BioRad) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз и фенилметансульфонилфторида (до конечных концентраций в растворе 1 %) [O'Farrell, 1975]. Образцы с содержанием общего белка 0,4–0,45 мг вносили в стеклянные капилляры, заполненные 3,84% полиакриламидным гелем с добавлением смеси амфолитов с диапазоном рН 3–10 и 5–7 (BioRad). Изоэлектрофокусирование проводили при помощи модифицированной системы BioRad Protean II Xi cell (США) в течение 18 ч, постепенно повышая силу тока от 100 до 900 мА. Затем гели извлекали из капилляров и инкубировали в растворе Лэммли (9% SDS, 6% β-меркаптоэтанол (объем/объем), 10% глицерин (объем/объем) с добавлением 2–5 мг бромфенолового синего в 0,2 М Трис-НСl, рН 6,7). Гели, полученные после изофокусирования, накладывали на 10% ПААГ-гели и проводили денатурирующий электрофорез по Лэммли [Laemmli, 1970] в ячейке системы BioRad Protean II Xi cell (США) с охлаждением. После проведения электрофореза гели были окрашены в течение 30 мин в растворе 0,2 % Кумасси G-250 в 25% изопропанол и 10% уксусной кислоте. Затем гели отмывали в 25% изопропанол и 10% уксусной кислоте 2 раза по 30 мин и помещали в дистиллированную воду на ночь. Окрашенные гели фотографировали при помощи системы гель-документации MiniLumi (Berthold Technologies).

Идентификация белков масс-спектрометрическими методами

Фрагменты геля, содержащие целевые белки, вырезали и измельчали ножницами. Для вымывания красителя и SDS фрагменты геля трижды промывали раствором 30 мМ Трис (Sigma), рН 8,2, в 50% ацетонитриле (LC-MS grade, LiChrosolv) в течение 15 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Затем фрагменты геля дегидратировали 100% ацетонитрилом. После удаления ацетонитрила пробы сушили на воздухе в течение 10 мин.

Для получения MALDI-масс-спектров к высушенному кусочку геля прибавляли 4 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0,05 М NH₄HCO₃ с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 18 ч при 37 °С, затем к раствору добавляли 7 мкл 0,5% трифторуксусной кислоты (ТФУ) в 10% растворе ацетонитрила в воде и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров.

По 0,5 мкл образца смешивали на мишени с раствором 2,5-дигидроксибензойной кислоты (20 мг/мл в растворе 20% ацетонитрила и 0,5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе. Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре (MALDI-TOF/TOF) Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенный УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,007 %.

Для идентификации белков методом тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии высушенные кусочки геля регидратировали в растворе трипсина (20 нг/мкл трипсина (Protein sequencing grade, Sigma), 30 мМ Трис, pH 8,2) на льду в течение часа, избыток раствора трипсина удаляли и вносили 45 мкл буфера для трипсинолиза (30 мМ Трис, pH 8,2). Трипсинолиз проводили в течение часа при 56 °С. Триптические пептиды экстрагировали из геля 50% ацетонитрилом, подкисленным 0,1% муравьиной кислотой (Sigma). Полученный раствор высушивали в вакуумном концентраторе CentriVap (Labronco) при 4 °С и растворяли в растворе 5% ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой. Хроматографическое разделение с последующей идентификацией белков было выполнено на базе ресурсного центра Методов анализа состава вещества Научного парка СПбГУ с использованием квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра Agilent ESI-Q-TOF 6538 UHD (Agilent Technologies), совмещенного с высокоэффективным жидкостным хроматографом Agilent 1260 (Agilent Technologies). Разделение пептидных фрагментов проводили в системе «вода – ацетонитрил» в присутствии 0,1% муравьиной кислоты (фаза А – 5% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота; фаза В – 90% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота) в градиенте ацетонитрила (от 5 до 60 % фазы В за 25 мин и до 100 % фазы В за 5 мин) на колонке Zorbax 300SB-C18 (Agilent Technologies; 3,5 мкм, внутренний диаметр 0,10 мм, длина 150 мм) со скоростью потока 15 мкл/мин. Анализ ионов проводили с частотой 3,3 спектра в секунду в режиме автоматического тандемного MS/MS-анализа с материнскими ионами 2+, 3+, n+. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск проводился в базе данных UniProt и NCBI среди белков всех организмов с указанной точностью с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом.

Статистическая обработка данных

Для количественного анализа белка проводили сравнение оптических плотностей белковых пятен, полученных на двумерных электрофореграммах. Сравнительный анализ полученных белковых паттернов выполняли с помощью пользовательского расширения для программы обработки изображений ImageJ Software. Выборка для анализа содержала по три электрофореграммы для каждого промежуточного хозяина гельминта. Статистическую обработку данных проводили с использованием параметрической статистики (Т-тест).

Результаты и обсуждение

В данной работе методом двумерного электрофореза растворимые белки *T. nodulosus* были разделены по заряду и по массе белковой молекулы. В результате получено девять электрофореграмм для плероцеркоидов из трех видов рыб – хозяев паразита. После компьютерной обработки изображений всех полученных полиакриламидных гелей их выравняли относительно друг друга, и был смоделирован суммарный гель, на котором разместили белковые паттерны всех образцов. Затем уникальный номер был присвоен каждому белковому пятну с одинаковыми координатами на всех гелях. После этого на каждом геле в области, соответствующей определенному пятну, измеряли оптическую плотность, которая, в свою очередь, зависит от концентрации белка в пятне.

Всего в пуле растворимых белков плероцеркоидов *T. nodulosus* было выявлено около 170 белковых пятен. При сравнении оптической плотности выделенных областей на геле у плероцеркоидов из разных видов рыб статистически значимые различия интенсивности окраски были получены лишь для 18 белковых пятен (рис. 1, 2), из которых с помощью масс-спектрометрических методов (MALDI-TOF/TOF, LC-MS) с высокой степенью достоверности удалось идентифицировать четыре белка (табл.). Далее для удобства в тексте идентифицированные белки обозначены согласно их названию, а неидентифицированные белки обозначены порядковым номером на суммарном геле.

Низкий процент идентифицированных белков связан с тем, что исследуемый вид не является модельным, поэтому для него отсутствуют базы данных расшифрованных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Так как в ходе анализа полу-

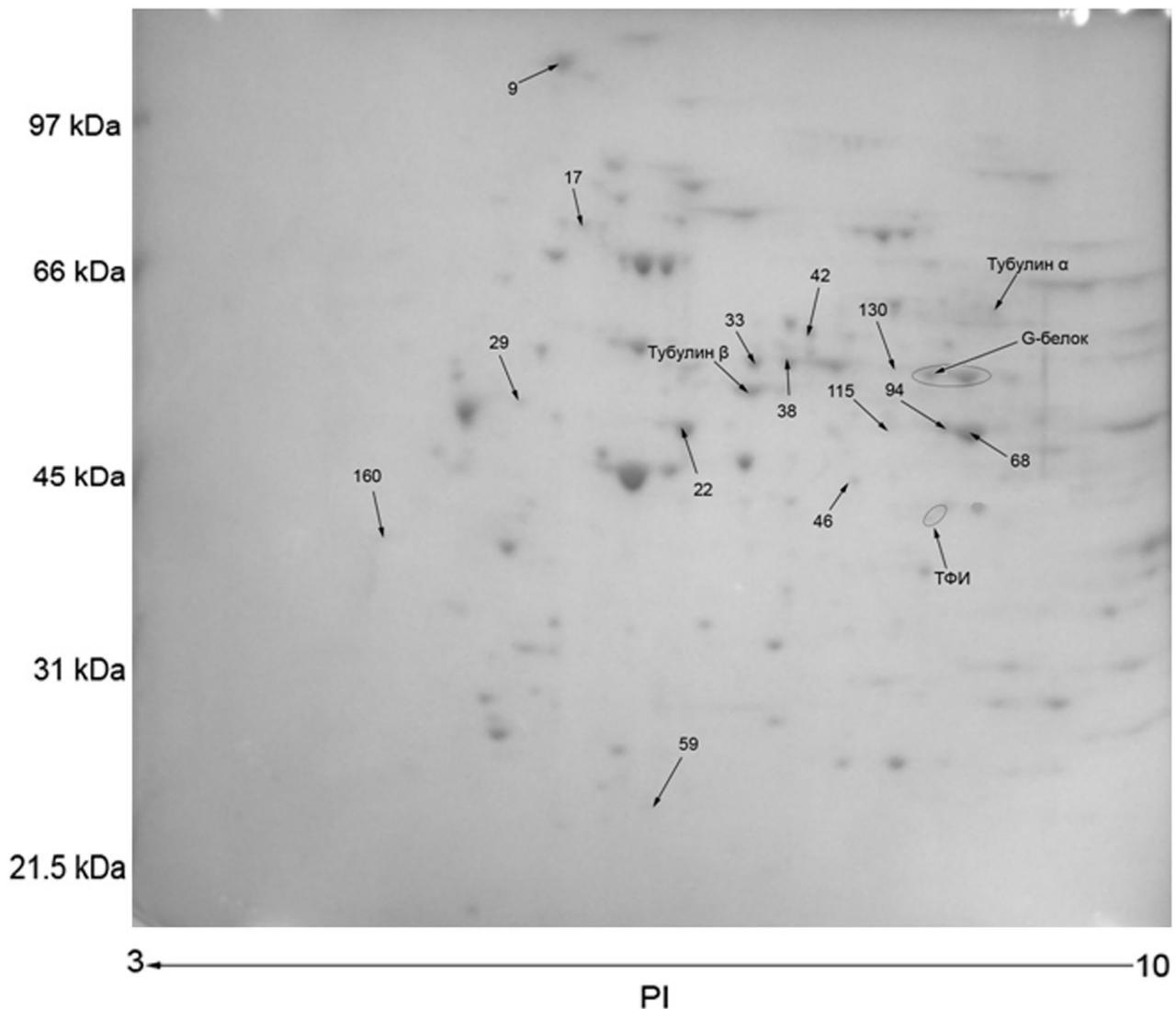


Рис. 1. Репрезентативная 2D-электрофореграмма водорастворимых белков плероцеркоидов *T. nodulosus*, на которой отмечены белковые пятна, различающиеся по оптической плотности при сравнении плероцеркоидов из различных хозяев

Fig. 1. Representative 2D electrophoregram of water-soluble proteins of the plerocercoids of *T. nodulosus*. Protein spots which differed in optical density in plerocercoids from different hosts are noted by arrows

ченные масс-спектры белков сравниваются с базами данных для близкородственных видов (*Hymenolepis diminuta*, *H. microstoma*, *H. nana*, *Taenia asiatica*, *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *Hydatigera taeniaeformis*, *Mesocestoides corti* (<http://www.uniprot.org/proteomes/?query=Cestoda>)), полученные результаты могут свидетельствовать о значительных отличиях структуры белков *T. nodulosus* от структуры белков других цестод.

Больше всего отличий было выявлено при сравнении белковых экстрактов из плероцеркоидов окуня и налима (14 пятен), тогда как плероцеркоиды налима от плероцеркоидов ерша отличались по 5 пятнам, а ерша от окуня – по 4 пятнам.

Следует также отметить, что из 14 белков, по которым у плероцеркоидов из разных хозяев наблюдались различия, 11 имели наибольшую оптическую плотность у плероцеркоидов окуня. Иными словами, у личинок червя из окуня эти белки синтезируются и накапливаются наиболее интенсивно. В свою очередь, у плероцеркоидов из налима концентрация всех 14 белков была наименьшей по сравнению с плероцеркоидами из двух других видов хозяев.

Из полученных данных установлено, что больше всего белковый состав отличается у плероцеркоидов из окуня и налима. Сниженная экспрессия 14 из 170 белков *T. nodulosus* в печени налима, по сравнению с личинками из других рыб, может быть результатом обще-

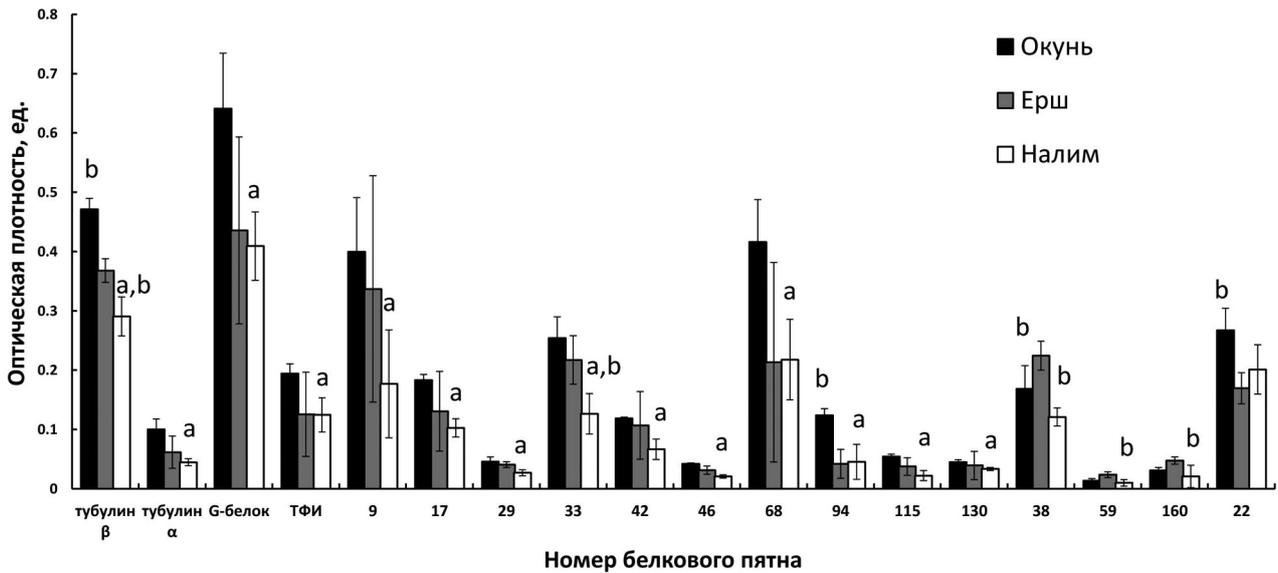


Рис. 2. Оптическая плотность некоторых белковых пятен на 2D-электрофореграммах водорастворимых белков плероцеркоидов *T. nodulosus* из разных хозяев:

a – различия статистически значимы по сравнению с плероцеркоидами из окуня ($p < 0.05$)

b – различия статистически значимы по сравнению с плероцеркоидами из ерша ($p < 0.05$)

Fig. 2. Optical density of some protein spots on 2D electrophoregrams of water-soluble protein of *T. nodulosus* plerocercoids from different hosts:

a – the differences are statistically significant in comparison with the plerocercoids from perch ($p < 0.05$)

b – the differences are statistically significant in comparison with the plerocercoids from the ruff ($p < 0.05$)

го замедления уровня обмена веществ паразитов и их хозяев в холодное время года (налим пойман зимой, а ерш и окунь осенью), а также отражать разную степень агрессивности среды для развития червя в разных видах хозяев. Динамика зараженности промежуточных хозяев в природе указывает на низкую резистентность налимов к заражению личинками *T. nodulosus*. Согласно Куперману [1973], из исследованных рыб европейской части России (корюшка, налим, щука, окунь) только у налима встречалась зараженность в количестве 7 и более плероцеркоидов на рыбу, при этом количество рыб с такой интенсивностью заражения составляло 43 % (при 88 % общей зараженности популяции) [Куперман, 1973]. Более благоприятные условия, позволяющие развиваться червям в налиме, предположительно, позволяют плероцеркоидам экономить на синтезе специфических белков, необходимых для поддержания жизнедеятельности и противодействия защитным реакциям хозяина. Окунь, в отличие от налимов, способен сопротивляться массированному заражению *T. nodulosus*, так как в природе чаще всего заражены всего одной особью гельминта (до 89 % рыб), тогда как особи с 7 и более плероцеркоидами не встречаются вовсе (при общей 42% зараженности популяции). Известно, что в большинстве водоемов само-

воспроизводство *T. nodulosus* происходит преимущественно именно через популяционные группировки, заражающие окуня, и это говорит о длительной коэволюции данных видов и, как следствие, формировании устойчивых и сбалансированных ценотических отношений [Иешко, 1988].

Нами было показано, что только один белок – тубулин β – имел разную экспрессию у всех трех видов хозяев. Наибольшая концентрация этой изоформы тубулина была у окуня, меньше белка обнаружено у ерша и меньше всего – у налима (рис. 3). Кроме того, содержание другой субъединицы тубулина α было больше у плероцеркоидов из окуня по сравнению с плероцеркоидами из налима. Из тубулина состоят микротрубочки – структуры, образующие цитоскелет, центриоли и веретено деления, которые необходимы для внутриклеточного транспорта, поддержания формы клеток и деления [Alberts et al., 1994]. Эти белки являются обязательными компонентами протеома любого организма и ранее были описаны у таких видов паразитических червей, как *E. multilocularis*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma bovis* и др. [Wang et al., 2009; De la Torre Escudero et al., 2011].

Еще один белок, содержание которого существенно выше у плероцеркоидов из окуня по сравнению с плероцеркоидами из налима,

Результаты идентификации белков плероцеркоидов *T. nodulosus* по степени совпадения с белковыми последовательностями родственных видов из базы данных Swissprot

Results of proteins identification of *T. nodulosus* plerocercoids according to the coincidence with the protein sequences from the Swissprot database for related species

Название белка Protein name	Родственный вид Related specie	ID аминокислотной последовательности белка родственного вида в базе данных GeneBank ID of amino acid sequence of protein of a related species in the GeneBank database	$M_r_{\text{теор}}/M_r_{\text{факт}}$ кДа $M_r_{\text{theoretical}}/M_r_{\text{actual}}$ kDa	Функциональная аннотация согласно базе данных Gene Ontology [GO Consortium, 2017] Functional annotation according to Gene Ontology database [GO Consortium, 2017]
Тубулин β Tubulin β	<i>Echinococcus multilocularis</i>	CAB91641.1	50/55	<p>Молекулярная функция: связывание ГТФ, ГТФазная активность, связывание нуклеотидов, структурный компонент цитоскелета.</p> <p>Биологический процесс: организация цитоскелета, образование микротрубочек.</p> <p>Клеточный компонент: цитоскелет, микротрубочки, цитоплазма.</p> <p>Molecular function: GTP binding, GTPase activity, nucleotide binding, structural constituent of cytoskeleton.</p> <p>Biological process: cytoskeleton organization, microtubule-based process.</p> <p>Cellular component: cytoskeleton, microtubule, cytoplasm.</p>
Тубулин α Tubulin α	<i>Hymenolepis microstoma</i>	CDS29993.2	49/64	
G-белок G-protein	<i>Echinococcus granulosus</i>	CDS20642.1.	33/55	<p>Молекулярная функция: ARF гуанилнуклеотид-обменный фактор; связывание рРНК, структурный компонент рибосом, трансдукция сигнала, связывание комплекса бета/гамма субъединицы G-белка, ГТФазная активность, связывание ГТФ, связывание рецептора G-белка; связывание ионов металла; Rho гуанилнуклеотид-обменный фактор, связывание гуанилнуклеотида.</p> <p>Биологический процесс: регуляция трансдукции сигнала через ARF-белок; трансляция; путь передачи сигнальный путь через рецептор G-белка.</p> <p>Клеточный компонент: рибосомы; гетеротримерный комплекс G-белка.</p> <p>Molecular function: guanyl-nucleotide exchange factor activity, rRNA binding, structural constituent of ribosome, signal transducer activity, G-protein beta/gamma-subunit complex binding, GTPase activity, GTP binding, G-protein coupled receptor binding, metal ion binding, Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity guanyl nucleotide binding.</p> <p>Biological process: regulation of ARF protein signal transduction, translation, G-protein coupled receptor signaling pathway.</p> <p>Cellular component: ribosomes, heterotrimeric G-protein complex.</p>
Триозофосфатизомераза (ТФИ) Triosephosphate isomerase	<i>Spirometra erinaceieuropaei</i>	AFX72997.1.	27/42	<p>Биологический процесс: гликолиз, глюконеогенез; пентозофосфатный путь; метаболический процесс.</p> <p>Молекулярная функция: триозофосфатизомеразная активность; каталитическая активность; изомеразная активность.</p> <p>Biological process: glycolysis, gluconeogenesis, pentose-phosphate shunt, metabolic process.</p> <p>Molecular function: triose-phosphate isomerase activity, catalytic activity, isomerase activity.</p>

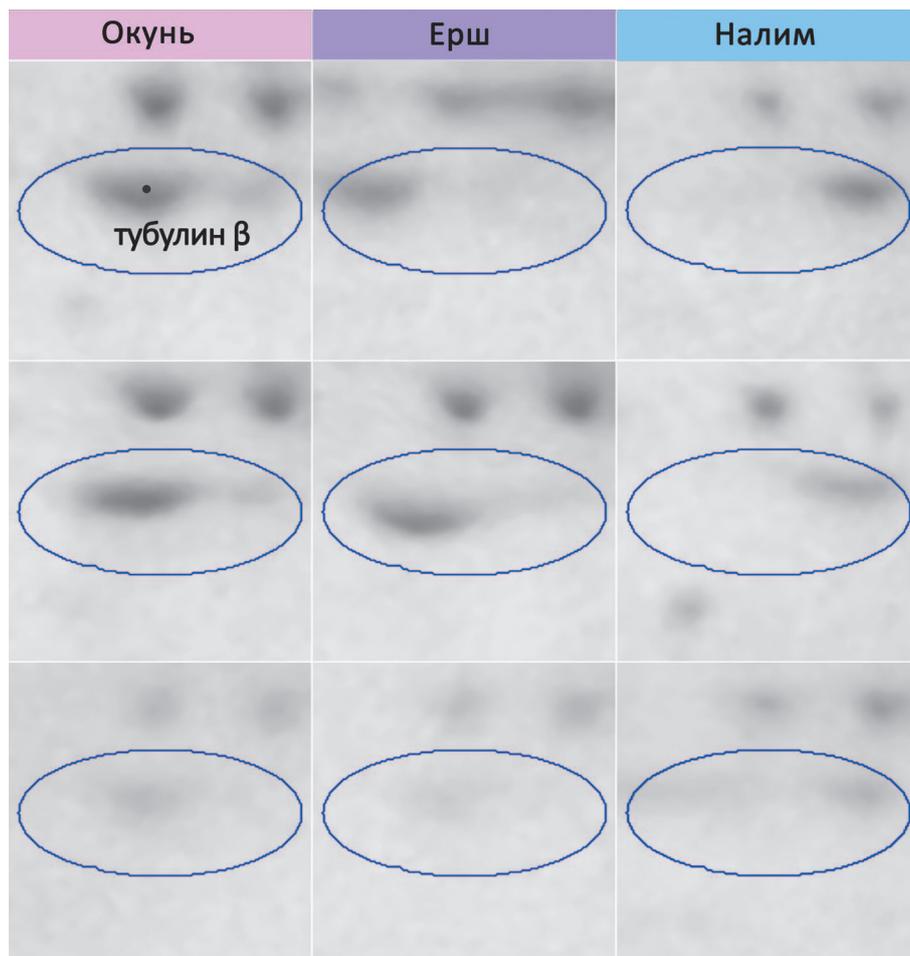


Рис. 3. Изображения области пятна № 24 (обведено), содержащего тубулин β , на 2D-электрофореграммах белков плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных промежуточных хозяев

Fig. 3. Images of the area of spot No. 24 (surrounded) containing tubulin β on the 2D electrophoregrams of the proteins of the plerocercoids of *T. nodulosus* from various intermediate hosts

был идентифицирован как принадлежащий к семейству G-белков. Это сигнальные молекулы, участвующие в качестве посредников во внутриклеточных сигнальных каскадах. Белок необходим для передачи информации от клеточных рецепторов, взаимодействующих с гормонами, нейротрансмиттерами, хемокинами и т. д. к эффекторам, отвечающим на это воздействие. G-белок принимает участие в регуляции жизненно важных процессов, например в эмбриональном развитии и поддержании гомеостаза в изменяющихся условиях среды [Neves et al., 2002].

Синхронное изменение содержания G-белка и мономерных форм тубулинов у плероцеркоидов из трех хозяев может свидетельствовать о том, что они задействованы в общем метаболическом пути, а именно в сигнальном пути G-белковой регуляции цитоскелета и клеточ-

ной морфологии [Yu et al., 2009; Schappi et al., 2014]. Известно, что субъединицы тубулина β обладают ГТФазной активностью и способны непосредственно связываться с альфа-субъединицей G-белков, что приводит к распаду тубулина на мономеры и к дезорганизации микротрубочек. Полученные данные могут указывать на то, что клетки плероцеркоидов из окуня имеют более динамичный цитоскелет, возможно, как результат более активных процессов пролиферации и дифференцировки под действием факторов среды. Ранее Куперман [1973] с помощью электронной микроскопии показал, что у плероцеркоидов уже имеются зачатки всех систем, характерных для половозрелых особей, однако они могут сильно различаться по степени развития органов. Выявленные вариации содержания тубулина у плероцеркоидов из всех трех изученных видов рыб могут

косвенно указывать на наличие у них морфологических различий на клеточном и тканевом уровне, и в том числе на разную степень зрелости личинок. Дополнительные гистологические исследования требуются для подтверждения данного предположения.

Еще в одной из областей на электрофореграммах, оптическая плотность в которой была достоверно выше у плероцеркоидов из окуня, чем у плероцеркоидов из налима, масс-спектрометрическими методами удалось идентифицировать две изоформы фермента углеводного обмена триозофосфатизомеразы, на геле представленных в виде функциональных димеров. Данный фермент участвует в процессе расщепления глюкозы – главного источника энергии для паразитических червей, которую они, как правило, извлекают из организма хозяина [Krautz-Peterson et al., 2010]. Более высокий уровень экспрессии одного из ключевых ферментов гликолиза и передачи сигнала у плероцеркоидов окуня по сравнению с плероцеркоидами из налима в целом свидетельствует о большей метаболической активности первых и менее интенсивном питании и обмене у вторых.

Следует также отметить, что помимо влияния сезона отбора проб и биохимического состава тканей хозяина выявленные различия содержания белков могут быть результатом генетических различий между отдельными популяциями паразитов, преимущественно выживающих в разных видах хозяев. Наличие таких генетически обособленных гостальных группировок было показано ранее [Van Putten et al., 2005], и для учета этого фактора требуется провести дополнительное генетическое исследование собранного полевого материала.

Полученные в данном исследовании масс-спектры белков *T. nodulosus* сравнивали также с базами данных белковых последовательностей рыб. Поглощение цистой белков хозяина было показано ранее на примере метацестод свиного цепня *Taenia solium* и финн *E. granulosus* [Victor et al., 2012; Cui et al., 2013]. Согласно литературным данным, в микроокружении паразита часто встречаются белки апоптоза и иммунного ответа хозяина, а также структурные белки и белки крови, возможно, попадающие в цисту в результате разрушения под действием протеолитических ферментов питающейся личинки. Так, пептидные фрагменты иммуноглобулинов, гемоглобина и транспортных белков крови свиньи были обнаружены в содержимом секреторных продуктов метацестоды свиного цепня *T. solium*, тогда как среди белков собственно паразита присутствовали различные протеазы цистеинового и треонинового

типа [Victor et al., 2012]. Также в окружении личинок встречаются белки хозяина, участвующие в поддержании обмена веществ, и сигнальные молекулы, что свидетельствует о химической коммуникации между паразитом и его хозяином. В настоящем исследовании среди белков, содержание которых различалось в экстрактах червей из разных хозяев, белков рыб не было обнаружено. Это косвенно (на уровне содержания мажорных белков – маркеров иммунного ответа) свидетельствует о сходном уровне воспаления в непосредственной близости от личинок. Тем не менее требуются дополнительные исследования белкового состава содержимого цисты, чтобы уточнить этот вопрос.

Заключение

Полученные результаты показывают, что среда обитания оказывает влияние на гельминта *T. nodulosus* на стадии инкапсулированной малоактивной личинки. На биохимическом уровне этот эффект проявляется в модификации содержания у личинок червя ряда белков. Среди идентифицированных нами белков, принимающих участие в этом процессе, присутствуют структурные белки, что, вероятно, связано с особенностью роста и развития личинок в разных видах хозяев. Также важную функцию выполняют сигнальные молекулы и ферменты гликолиза.

Мы предположили, что личинки из окуня находятся в менее благоприятных условиях по сравнению с личинками из налима, так как, судя по более высокой экспрессии ряда белков, они метаболически более активны. Личинки из ерша по этим показателям занимают промежуточное положение. Эти результаты могут отражать как влияние абиотических факторов (температура окружающей среды), так и биохимическую разнокачественность микросреды, формируемой хозяевами из разных таксономических групп (окунь и ерш – семейство Окуневые, налим – Тресковые).

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-01700 «Изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе жизнедеятельности и экологии представителей класса цестоды, методами протеомики».

Литература

Аникиева Л. В. Морфологическая изменчивость цестод рода *Proteocephalus* (Cestoda, Proteocephalidae) при паразитировании в факультативных хозяевах // Паразитология. 1995. Т. 29, № 6. С. 505–510.

Аникиева Л. В. Принципы популяционной морфологии в систематике цестод // Проблемы цестодологии. 1998. С. 33–40.

Аникиева Л. В., Доровских Г. Н. Полиморфизм и внутривидовая изменчивость специфического паразита корюшек – цестоды *Proteocephalus tetrastomus* (Rudolphi, 1810) (Cestoda: *Proteocephalidae*) // Паразитология. 2009. Т. 43, № 4. С. 309–316.

Аникиева Л. В., Иешко Е. П., Лебедева Д. И. Морфологическая изменчивость цестоды *Proteocephalus percae* (Müller 1780), паразитирующей у сиговых рыб // Паразитология. 2015. Т. 49, № 3. С. 160–170.

Гиченок А. А. Изменчивость и фенотипическое разнообразие скребня *Echinorhynchus gadi* (*Acanthoserphala*) из двух видов беломорских рыб // Зоологический журнал. 1995. Т. 74, № 8. С. 15–62.

Жигилева О. Н. Взаимосвязь зараженности гельминтами и генетического разнообразия популяций животных: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Тюмень, 2017. 415 с.

Крылов Ю. М. Активность ЛДГ и изменение спектра ее изоферментов в печени леща *Abramis brama* при паразитировании плероцеркоидов цестоды *Digramma interrupta* // Паразитология. 1993. Т. 27, № 4. С. 332–335.

Куперман Б. И. Ленточные черви рода *Triaenophorus* – паразиты рыб (экспериментальная систематика, экология). Л.: Наука, 1973. 207 с.

Иешко Е. П. Популяционная биология гельминтов рыб. Л.: Наука, 1988. 118 с.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell (third edition). New York; London: Garland Publ., 1994. 1361 p. doi: 10.1016/0307-4412(94) 90059-0

Bradford M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical biochemistry. 1976. Vol. 72. P. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Cui S. J., Xu L. L., Zhang T., Xu M., Yao J., Fang C. Y., Feng Z., Yang P. Y., Hu W., Liu F. Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host – parasite interactions // J. Proteom. 2013. Vol. 84. P. 158–175. doi: 10.1016/j.jprot.2013.04.013

De la Torre Escudero E., Manzano-Román R., Valero L., Oleaga A., Pérez-Sánchez R., Hernández-González A., Siles-Lucas M. Comparative proteomic analysis of *Fasciola hepatica* juveniles and *Schistosoma bovis* schistosomula // J. Proteom. 2011. Vol. 74. P. 1534–1544. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.024

GO Consortium. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources // Nucleic Acids Re-

search. 2017. Vol. 45. P. 331–338. doi: 10.1093/nar/gkw1108

Krautz-Peterson G., Simoes M., Faghiri Z., Ndegwa D., Oliveira G., Shoemaker C. B., Skelly P. J. Suppressing glucose transporter gene expression in schistosomes impairs parasite feeding and decreases survival in the mammalian host // PLoS Pathog. 2010. Vol. 6, no. 6. e1000932. doi: 10.1371/journal.ppat.1000932

Kuchta R., Vlcková R., Poddubnaya L. G., Gustinelli A., Dzika E., Scholz T. Invalidity of three Palaearctic species of *Triaenophorus* tapeworms (Cestoda: Pseudophyllidae): evidence from morphometric analysis of scolex hooks // Folia Parasitol (Praha). 2007. Vol. 54, no. 1. P. 34–42. doi: 10.14411/fp.2007.005

Laemmli U. K. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.

Neves S. R., Ram P. T., Iyengar R. G protein pathways // Science. 2002. Vol. 296. P. 1636–1639. doi: 10.1126/science.1071550

O'Farrell P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250, no. 10. P. 4007–4021.

Schappi J. M., Krbanjevic A., Rasenick M. M. Tubulin, actin and heterotrimeric G proteins: coordination of signaling and structure // Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1838, no. 2. P. 674–681. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.08.026

Van Putten W. F., Biere A., Van Damme J. M. M. Host-related genetic differentiation in the anther smut fungus *Microbotryum violaceum* in sympatric, parapatric and allopatric populations of two host species *Silene latifolia* and *S. dioica* // J. Evol. Biol. 2005. Vol. 18, no. 1. P. 203–212. doi: 10.1111/j.1420-9101.2004.00771.x

Victor B., Kanobana K., Gabrie S., Polman K., Deckers N., Dorny P., Deelder A. M., Palmblad M. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion – secretion proteins // Proteomics. 2012. Vol. 12. P. 1860–1869. doi: 10.1002/pmic.201100496

Wang Y., Cheng Z., Lu X., Tang C. *Echinococcus multilocularis*: Proteomic analysis of the protoscoleces by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry // Experimental Parasitology. 2009. Vol. 123, no. 2. P. 162–167. doi: 10.1016/j.exppara.2009.06.014

Yu J. Z., Dave R. H., Allen J. A., Sarma T., Rasenick M. M. Cytosolic G {alpha} s acts as an intracellular messenger to increase microtubule dynamics and promote neurite outgrowth // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284, no. 16. P. 10462–10472. doi: 10.1074/jbc.M809166200

Поступила в редакцию 08.08.2018

References

Anikieva L. V. Morfologicheskaya izmenchivost' tsestod roda *Proteocephalus* (Cestoda, *Proteocephalidae*) pri parazitirovanii v fakul'tativnykh khozyaevakh [Morphological variability of cestodes of the genus *Proteocephalus* (Cestoda, *Proteocephalidae*) parasitizing in facultative hosts]. *Parazitologiya* [Parasitology]. 1995. Vol. 29, no. 6. P. 505–510.

Anikieva L. V. Printsipy populyatsionnoi morfologii v sistematike tsestod [Principles of population morphology in the systematics of cestodes]. *Probl. tsestodologii* [Issues of Cestodology]. 1998. P. 33–40.

Anikieva L. V., Dorovskikh G. N. Polimorfizm i vnutrividovaya izmenchivost' spetsifichnogo parazita korjushek – cestody *Proteocephalus tetrastomus* (Ru-

dolphi, 1810) (Cestoda: Proteocephalidea) [Polymorphism and intraspecific variability of a specific parasite of smelt – cestodes *Proteocephalus tetraostomus* (Rudolphi, 1810) (Cestoda: Proteocephalidea)]. *Parazitologiya* [Parasitology]. 2009. Vol. 43, no. 4. P. 309–316.

Anikieva L. V., Ieshko E. P., Lebedeva D. I. Morfolo­gicheskaya izmenchivost' tsestody *Proteocephalus percae* (Müller 1780), parazitiruyushchei u sigovykh ryb [Morphological variability of whitefish parasite cestode *Proteocephalus percae* (Müller 1780)]. *Parazitologiya* [Parasitology]. 2015. Vol. 49, no. 3. P. 160–170.

Gichenok A. A. Izmenchivost' i fenotipicheskoe raznoobrazie skrebnya *Echinorhynchus gadi* (Acanthocephala) iz dvukh vidov belomorskikh ryb [Variability and phenotypic diversity of acanthocephala *Echinorhynchus gadi* (Acanthocephala) from two species of the White Sea fish]. *Zool. zhurn.* [Zool. J.]. 1995. Vol. 74, no. 8. P. 15–62.

Ieshko E. P. Populyatsionnaya biologiya gel'mintov ryb [Population biology of fish helminths]. Leningrad: Nauka, 1988. 118 p.

Krylov Yu. M. Aktivnost' LDG i izmenenie spektra ee izofermentov v pecheni Ieshcha *Abramis brama* pri parazitirovanii plerotserkoidov tsestody *Digamma interrupta* [LDH activity and changes in the spectrum of its isoenzymes in the liver of *Abramis brama* bream infected by plerocercoids of cestoda *Digamma interrupta*]. *Parazitologiya* [Parasitology]. 1993. Vol. 27, no. 4. P. 332–335.

Kuperman B. I. Lentochnye chervi roda *Triaenophorus* – parazity ryb (eksperimental'naya sistematika, ekologiya) [Tapeworms of the genus *Triaenophorus* are parasites of fish (experimental systematics, ecology)]. Leningrad: Nauka, 1973. 207 p.

Zhigileva O. N. Vzaimosvyaz' zarazhennosti gel'mintami i geneticheskogo raznoobraziya populyatsii zhi­votnykh [Interrelation of helminth infection and genetic diversity of animal populations]: Summary of DSc (Dr of Biol.) thesis. Tyumen', 2017. 415 p.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell (third edition). New York; London: Garland Publ., 1994. 1361 p. doi: 10.1016/0307-4412(94)90059-0

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. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Cui S. J., Xu L. L., Zhang T., Xu M., Yao J., Fang C. Y., Feng Z., Yang P. Y., Hu W., Liu F. Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host – parasite interactions. *J. Proteom.* 2013. Vol. 84. P. 158–175. doi: 10.1016/j.jprot.2013.04.013

De la TorreEscudero E., Manzano-Román R., Valero L., Oleaga A., Pérez-Sánchez R., Hernández-González A., Siles-Lucas M. Comparative proteomic analysis of *Fas-*

ciola hepatica juveniles and *Schistosoma bovis* schistosomula. *J. Proteom.* 2011. Vol. 74. P. 1534–1544. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.024

GO Consortium. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Research.* 2017. Vol. 45. P. 331–338. doi: 10.1093/nar/gkw1108

Krautz-Peterson G., Simoes M., Faghiri Z., Ndegwa D., Oliveira G., Shoemaker C. B., Skelly P. J. Suppressing glucose transporter gene expression in schistosomes impairs parasite feeding and decreases survival in the mammalian host. *PLoS Pathog.* 2010. Vol. 6, no. 6. e1000932. doi: 10.1371/journal.ppat.1000932

Kuchta R., Vlcková R., Poddubnaya L. G., Gustinelli A., Dzika E., Scholz T. Invalidity of three Palaearctic species of *Triaenophorus* tapeworms (Cestoda: Pseudophyllidea): evidence from morphometric analysis of scolex hooks. *Folia Parasitol (Praha)*. 2007. Vol. 54, no. 1. P. 34–42. doi: 10.14411/fp.2007.005

Laemmli U. K. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.

Neves S. R., Ram P. T., Iyengar R. G protein pathways. *Science*. 2002. Vol. 296. P. 1636–1639. doi: 10.1126/science.1071550

O'Farrell P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250, no. 10. P. 4007–4021.

Schappi J. M., Krbanjevic A., Rasenick M. M. Tubulin, actin and heterotrimeric G proteins: coordination of signaling and structure. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. Vol. 1838, no. 2. P. 674–681. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.08.026

Van Putten W. F., Biere A., Van Damme J. M. M. Host-related genetic differentiation in the anther smut fungus *Microbotryum violaceum* in sympatric, parapatric and allopatric populations of two host species *Silene latifolia* and *S. dioica*. *J. Evol. Biol.* 2005. Vol. 18, no. 1. P. 203–212. doi: 10.1111/j.1420-9101.2004.00771.x

Victor B., Kanobana K., Gabrie S., Polman K., Deckers N., Dorny P., Deelder A. M., Palmblad M. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion – secretion proteins. *Proteomics*. 2012. Vol. 12. P. 1860–1869. doi: 10.1002/pmic.201100496

Wang Y., Cheng Z., Lu X., Tang C. *Echinococcus multilocularis*: Proteomic analysis of the protoscoleces by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Experimental Parasitology*. 2009. Vol. 123, no. 2. P. 162–167. doi: 10.1016/j.exppara.2009.06.014

Yu J. Z., Dave R. H., Allen J. A., Sarma T., Rasenick M. M. Cytosolic G {alpha} s acts as an intracellular messenger to increase microtubule dynamics and promote neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, no. 16. P. 10462–10472. doi: 10.1074/jbc.M809166200

Received August 08, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кочнева Альбина Александровна

младший научный сотрудник лаб. экологической биохимии
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: kochnevaalbina@gmail.com
тел.: (8142) 769810

Борвинская Екатерина Витальевна

научный сотрудник лаб. экологической биохимии, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: borvinska@gmail.com
тел.: (8142) 769810

Бедулина Дарья Сергеевна

старший научный сотрудник
лаб. «Проблемы адаптации биосистем»
Иркутский государственный университет, НИИ биологии
ул. Ленина, 3, Иркутск, Россия, 664003
эл. почта: daria.bedulina@gmail.com
тел.: (3952) 243077

Суховская Ирина Викторовна

научный сотрудник лаб. экологической биохимии, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: sukhovskaya@inbox.ru
тел.: (8142) 769810

CONTRIBUTORS:

Kochneva, Albina

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

Borvinskaya, Ekaterina

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

Bedulina, Darya

Institute of Biology at Irkutsk State University
3 Lenin St., 664003 Irkutsk, Russia
e-mail: daria.bedulina@gmail.com
tel.: (3952) 243077

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.: (8142) 769810

УДК 582.632:581.132:581.52

СО₂-ГАЗООБМЕН РАСТЕНИЙ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ, ВЫРАЩИВАЕМЫХ В УСЛОВИЯХ РАЗНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ АЗОТОМ

В. К. Болондинский, Л. М. Виликайнен

Институт леса КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

Проведена сравнительная оценка СО₂-газообмена у листьев 5–6-летних саженцев двух форм березы повислой (*Betula pendula* и *Betula pendula* var. *carelica*) и березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh., 1789), выращиваемых при различных уровнях азотного питания. Исследования проводились на Агробиологической станции КарНЦ РАН, расположенной на южной окраине г. Петрозаводска на пяти площадях (контрольный сектор, три сектора с внесением разных доз азотного удобрения NH₄NO₃ и сектор с комплексным удобрением). Как в контрольном секторе (содержание азота 0,23 ± 0,04 %), так и на большей части удобряемых участков не было получено значимой разницы в средних величинах фотосинтеза между березой повислой и карельской березой для всего диапазона ФАР и для ФАР > 1400 мкмоль м⁻² с⁻¹. Подкормка азотными удобрениями благотворно сказалась на росте и величинах СО₂-газообмена исследуемых объектов. Рассчитанные параметры моделей световых кривых фотосинтеза показали повышение эффективности работы фотосинтетического аппарата после внесения удобрений. При низких значениях ФАР она была значительно выше у карельской березы, чем у березы повислой, и возрастала при увеличении дозы азота. При почвенной засухе не было получено достоверных различий содержания хлорофилла в листьях у удобренных и неудобренных растений. Количество каротиноидов было в 1,3–1,5 раза выше в листьях неудобренных растений относительно удобренных. Внесение даже небольших доз азотного удобрения (20 г на дерево) благоприятно сказывалось на оводненности листьев растений в засушливый период. На второй год внесения удобрений значительно усилилась полуденная депрессия фотосинтеза, особенно в секторах с высокими дозами внесения азота. Тогда как на контрольном участке снижение фотосинтеза с 13 до 16 часов при отсутствии атмосферной засухи и при хорошей оводненности почвы составляло 20–25 %, на удобряемых участках скорость фотосинтеза уменьшалась более чем в три раза. Данное обстоятельство приводило к тому, что во вторую половину вегетации в солнечные дни суточная продуктивность фотосинтеза у удобренных растений была ниже, чем у неудобренных. В первый год внесения удобрений сильной полуденной депрессии не наблюдалось и подкормка азотом способствовала поглощению углекислоты как в пасмурные, так и в солнечные дни.

Ключевые слова: *Betula pendula* var. *carelica*; СО₂-газообмен; дыхание; световые кривые фотосинтеза; хлорофилл; азотное питание.

V. K. Bolondinskii, L. M. Vilikainen. GASEOUS CO₂ EXCHANGE IN SILVER BIRCH SAPLINGS GROWING UNDER DIFFERENT LEVELS OF NITROGEN SUPPLY

A comparative assessment of gaseous CO₂ exchange in leaves of 5–6 years old saplings of two forms of silver birch (*Betula pendula* and *Betula pendula* var. *carelica*) and downy

birch (*Betula pubescens* Ehrh., 1789) growing under different levels of nitrogen nutrition was done. The study was carried out in five plots (control sector, three sectors fertilized with different doses of NH_4NO_3 , and a sector with NPK fertilization) at the Agrobiological Research Station of the Karelian Research Centre RAS located at the southern outskirts of Petrozavodsk. Both in the control sector (where the content of nitrogen was $0.23 \pm 0.04\%$) and in most of the fertilized sectors, there was no significant difference between the mean values of photosynthesis in *B. pendula* and *B. pendula* var. *carelica* either for the entire PhAR range or for $\text{PhAR} > 1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{c}^{-1}$. Nitrogen fertilization had a beneficial effect on the growth and the magnitude of gaseous CO_2 exchange of the studied objects. The calculated parameters of light response curves for net photosynthesis have shown an improved performance of the photosynthetic apparatus upon fertilization. Where PhAR values were low, its efficiency in Karelian birch was much higher compared with silver birch (*B. pendula*), and increased with the elevation of the nitrogen dosage. In the conditions of soil moisture shortage, there was no significant difference between chlorophyll content in leaves of fertilized and non-fertilized plants. The carotenoid content in the leaves of non-fertilized plants was 1.3–1.5-fold that of fertilized plants. Even a small dose of nitrogen fertilizer (20 g per tree) had a favorable effect on the water content of leaves in a dry period. In the second year of fertilization, the midday depression of photosynthesis increased considerably, especially in the sectors with high doses of nitrogen fertilizer. In the control sector, the decrease in photosynthesis in the absence of air drought and with sufficient soil moisture content was 20–25 %, and in fertilized plots there was a more than three-fold decrease in photosynthesis from 13:00 to 16:00. As a result, on sunny days in the second part of the growing season daily photosynthetic production in fertilized plants was lower compared to non-fertilized ones. In the first year of fertilization, there was no strong midday depression of photosynthesis, and nitrogen fertilization promoted CO_2 uptake on both cloudy and sunny days.

Key words: *Betula pendula* var. *carelica*; gaseous CO_2 exchange; respiration; light response curve for net photosynthesis; chlorophyll; nitrogen nutrition.

Введение

Вопросы влияния азота и других элементов минерального питания на ростовые процессы и газообмен растений важны как в научном, так и в практическом значении, особенно при изучении древесных видов на ранних этапах их развития. На различных видах берез выполнено довольно много работ, в которых исследуется связь фотосинтеза и минерального питания [Wendler, Millard, 1996; Wang et al., 1998 и др.]. На карельской березе такие исследования появились только в последнее время [Болондинский, Виликайнен, 2014; Pridacha et al., 2017; Придача и др., 2018].

Одним из признаков карельской березы является свилеватость структурных элементов древесины, а также уменьшение числа сосудов, увеличение количества клеток запасающей паренхимы в ксилеме. Все эти факторы увеличивают сопротивление движению влаги в стволе, что отражается в уменьшении скорости водного потока по ксилеме и, как следствие, ограничении проводимости устьиц для молекул CO_2 . В результате процессы фотосинтеза карельской березы и березы повислой с нормальной древесиной могут различаться как в суточной динамике, так и в отклике на воздействие

факторов окружающей среды. Адаптационная стратегия карельской березы направлена на оптимизацию процесса поглощения углекислоты. Растение использует весь арсенал физиологических возможностей, чтобы максимизировать процесс фотосинтеза и повысить поглощение углекислоты. Для их реализации требуется достаточное количество азота и других питательных веществ в почве. Однако дополнительное азотное питание в определенных условиях может привести у отдельных экземпляров карельской березы к еще большему увеличению сопротивления ствола и в конечном итоге к устьичному ограничению фотосинтеза [Придача и др., 2018].

Лесные почвы евроазиатской лесной области крайне бедны питательными элементами, особенно аммиачным азотом, и не обеспечивают ими в нужном количестве древесные растения [Паавилайнен, 1983]. Во многих работах показано многообразное воздействие азота на активность или блокирование физиологических процессов у древесных растений [Зарубина, Коновалов, 2014; Лебедев, 2015 и др.]. Причиной усиления роста и дыхания корней у подростка под влиянием азота являлось ускоренное и усиленное снабжение корней ассимилятами, поступающими к ним из кроны.

Количество корней на площадках с удобрениями было на 32–65 % больше, чем в контроле [Зарубина, Коновалов, 2014]. Обычно скорость фотосинтеза коррелирует с концентрацией азота в листьях березы [Wang et al., 1998; Hoogesteger, 2006], но связь между поступлением азота из почвы и его концентрацией в листе достаточно сложна и опосредована внешними факторами среды, например влажностью воздуха [Sellin et al., 2013]. При низкой влажности воздуха, вызывающей прикрытие устьиц, транспирационный поток, с которым поступают питательные вещества, снижается, что, наряду с уменьшением устьичной проводимости, является причиной уменьшения фотосинтеза.

Многие работы выполнялись на 1–2-летних саженцах, выращиваемых преимущественно в вегетационных сосудах. Очень мало работ, где бы исследования CO_2 -газообмена, транспирации и роста березы и других древесных пород осуществлялись на 1–2-метровых саженцах, растущих на плантации. На практике саженцы обычно не удобряют, так как от этого активно развивается травянистый покров, который заглушает посадочный материал. Практически все исследования проводятся на деревьях начиная с 15–20-летнего возраста, после смыкания крон, когда травянистый покров оказывается в тени и перехватывает лишь малую часть вносимого азота.

Задачей нашего исследования было выявление зависимости фотосинтеза и дыхания от внешних факторов среды у 5–6-летних саженцев карельской березы и березы повислой в условиях разной обеспеченности элементами минерального питания.

Материалы и методы

Основные исследования проводились на Агробиологической станции КарНЦ РАН (64°45' с. ш. 34°20' в. д.) на четырех площадках (контрольный сектор и три участка с внесением разных доз азотного удобрения). Небольшая часть экспериментов проводилась на пятой площадке, где вносилось комплексное удобрение. 2–3-летние саженцы карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti, 1984), березы повислой (*Betula pendula* Roth var. *Pendula*) и березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh., 1789) были высажены в 2010 г. рядами (с размещением на расстоянии 1,5 м между рядами и 1,5 м в ряду) на поле (20×80 м), имевшем небольшой уклон с запада на восток. С 10 до 15 часов большинство саженцев не попадали в тень от больших деревьев.

Поле было разбито на пять площадей (секторов). В нижней части находился контрольный сектор (К), который не удобрялся, но под каждое дерево в круг диаметром 1 метр с деревом посередине вливалось ведро чистой воды в момент внесения в других секторах удобрений, растворенных в 10 л воды. Выше по склону следовали сектора с различными дозами вносимых удобрений: N20 – вносился азот из расчета 20 г (58 г NH_4NO_3 на одно растение за сезон), N40 – азот из расчета 40 г (116 г NH_4NO_3 на одно растение за сезон), N60 – азот из расчета 60 г (174 г NH_4NO_3 на одно растение за сезон), NPK – комплекс NPK из расчета соотношения веществ 100 : 10 : 50, азот по дозе внесения 40 г/сезон.

В секторе NPK вносился азот в виде NH_4NO_3 , фосфор в виде P_2O_5 , калий в виде K_2CO_3 (в итоге N : P : K = 40 : 4 : 20). Растения удобряли 4 раза с 31 мая по 15 июля 2013 г. и 4 раза с 3 июня по 14 июля в 2014 г. Измерения проводили через 5–6 дней после полива растений питательной смесью. На границе участков были вырыты траншеи глубиной 60–70 см, в которые закладывались листы линолеума, предотвращающие миграцию питательных элементов. В ходе эксперимента все участки поля выкашивали не менее трех раз за сезон.

Измерения CO_2 -газообмена проводились в течение двух месяцев на березе повислой и карельской березе с помощью портативной фотосинтетической системы Li-6200 (LiCor, USA). На березе пушистой было проведено ограниченное количество исследований, в основном в секторах К и N60. Главное внимание уделялось двум формам березы повислой. В каждом секторе выбирали три дерева, на каждом из которых измерения проводили на 3–4 листьях, растущих на хорошо освещенных ветвях.

Для снятия световых кривых камеру с листом ориентировали прямо на солнце и покрывали разным количеством слоев ткани или тканью разной плотности. После каждого уменьшения освещенности измеряли все показатели, регистрируемые прибором (ΦAP , CO_2 -газообмен, концентрация CO_2 в камере, температура и влажность воздуха в камере и т. д.). Эксперименты в основном проводили в безоблачные дни в дневной динамике с 10 до 16 часов.

Световую кривую фотосинтеза моделировали с помощью нелинейного регрессионного анализа гиперболой (функция Микаэлиса – Ментен):

$$P(I(x,t)) = a_1 + b_1 \times I(x,t) / (I(x,t) + b_2),$$

где a_1 – параметр, характеризующий CO_2 -газообмен при $I(\Phi\text{AP}) = 0$ мкмоль $\text{m}^{-2} \text{c}^{-1}$, т. е. уро-

вень дыхания (R); b_1 – величина фотосинтеза при насыщающих значениях ΦAP (P_{max}); b_2 (константа насыщения) – параметр, равный величине I , при которой $P = 0,5 P_{max}$, и являющийся характеристикой скорости насыщения световой кривой; t – время; x – переменная, характеризующая положение листа в пространстве. Из уравнения Микаэлиса – Ментен рассчитывали световой компенсационный пункт (СКП) и тангенс угла наклона световой кривой ($\text{tg } \alpha$). Все параметры модели имеют определенный физиологический смысл, и их можно интерпретировать как потенциальную эколого-физиологическую характеристику изучаемого вида. Между ними существуют определенные взаимосвязи, изменяющиеся в процессе вегетации. Проверку гипотез и оценку существенных различий между средними величинами осуществляли с помощью критерия Стьюдента при 5%-м уровне значимости (p).

Содержание хлорофиллов и суммы каротиноидов в ацетоновой вытяжке определяли спектрофотометрически (СФ-2000, «ОКБ Спектр», Россия). Расчет содержания пигментов производили в мг на г сырого веса листа. Содержание азота в 5–15-см слое почвы (N) определяли титриметрическим методом по Кьельдалю [Методическое..., 1990]. Результаты представлены в процентах от сухого веса образцов. Повторность проб трехкратная. Данные получены с использованием оборудования ЦКП Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты и обсуждение

Почва контрольного сектора была умеренно плодородия. Содержание азота в почвенном слое 5–15 см, измеренное вблизи опытных деревьев в первый год эксперимента через месяц после последнего внесения удобрений, составило 0,18–0,33 %. В других секторах оно было выше: сектор N60 – 0,21–0,50 %, сектор N40 – 0,29–0,39 %, сектор N20 – 0,25–0,36 %, сектор NPK – 0,27–0,52 %.

Значительная часть измерений фотосинтеза проведена при пониженной освещенности. При этом значения фотосинтеза, измеряемые в пасмурные дни или при солнце в облаках, были выше, чем при той же освещенности во время принудительного снижения освещенности листьев в процессе измерения световых кривых фотосинтеза. Все эти факторы являлись причиной очень высокой вариабельности фотосинтеза. За период измерений в 2013–2014 гг. внешние условия были благоприятными и не наблюдалось ни сильной засухи,

ни больших температурных колебаний. Небольшая почвенная засуха в конце июня – первой половине июля 2013 г., сопровождавшаяся умеренной температурой воздуха, повлияла на процессы CO_2 -газообмена, особенно в контрольном секторе, снизив в среднем величины поглощения CO_2 листьями на 20–25 %. В других секторах снижение фотосинтеза не превышало 15–18 %. При этом полуденная депрессия фотосинтеза не носила ярко выраженного характера, в том числе и на контрольном участке. Не было получено достоверных различий содержания хлорофилла в листьях у удобренных и неудобренных растений. Количество же каротиноидов в листьях неудобренных растений возрастало в 1,3–1,5 раза, что выразилось в появлении у них желтого оттенка. После дождей наблюдалось восстановление фотосинтетической способности до прежнего уровня. Даже небольшие дозы азотного удобрения (20 г на дерево) благоприятно сказывались на оводненности листьев удобренных растений в засушливый период. Листья контрольного участка имели выцветший, склерофильный (жестколистный) вид. Признаки склерофильности присутствовали и у удобренных растений, но носили менее выраженный характер. Удобрения вносились, когда в почве было еще достаточно влаги, и способствовали развитию корневой системы. В дальнейшем это сказало на снабжении растений влагой и на том, что у удобренных саженцев устьичное ограничение фотосинтеза было не таким сильным, как у саженцев контрольного сектора.

Сильной атмосферной засухи в 2013–2014 гг. не наблюдалось. Лишь в течение одного дня измерений дефицит водяных паров в воздухе (D) превысил 2000 Па, а средние величины этого показателя во время измерений фотосинтеза были все время ниже 1250 Па. В диапазоне $\Phi AP > 1400$ мкмоль $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ средние величины D составляли 970 ± 40 Па. Даже при легкой почвенной засухе такие величины D не приводят к устьичному ограничению фотосинтеза [Болондинский, 2010]. Температурный фактор в период измерений также не оказывал существенного влияния на процесс фотосинтеза. Температура воздуха в период измерений колебалась в пределах 16–25 °С. Средние величины составили $20,5 \pm 2,1$ °С и являлись оптимальными для фотосинтеза. В большей степени температура влияла на темновое дыхание. В ряде случаев понижение температуры всего на 5–6 °С вело к уменьшению абсолютной величины дыхания на 80–100 %.

При сравнении средних величин фотосинтеза двух секторов учитывали, имеются ли досто-

Таблица 1. Средние величины фотосинтеза и дыхания в июле–августе 2013 г. у *B. pendula* var. *carelica* (БК), *B. pendula* var. *pendula* (БП) и *B. pubescens* (БПуш) в контрольном секторе (К) и в секторе N60 в первый год внесения удобрений

Table 1. Mean values of photosynthesis and respiration of *B. pendula* var. *carelica* (БК), *B. pendula* var. *pendula* (БП) and *B. pubescens* (БПуш) in the control sector (К) and in the N60 sector in the first year of applying fertilizers

	К			N60		
	$P_{PhAR>0}$	$P_{PhAR>1400}$	R	$P_{PhAR>0}$	$P_{PhAR>1400}$	R
БК	8,0 ± 0,7	12,6 ± 1,1	-2,6 ± 0,2	11,3 ± 1,0*	14,2 ± 0,9*	-3,4 ± 0,3*
БП	8,0 ± 0,7	12,5 ± 1,0	-2,7 ± 0,2	8,4 ± 0,7	11,7 ± 1,1	-3,0 ± 0,2
БПуш	9,0 ± 1,1	15,6 ± 1,4	-2,7 ± 0,2	12,4 ± 1,1*	16,5 ± 1,0	-3,3 ± 0,3

Примечание. $PhAR$ – ФАР (мкмоль фотонов $m^{-2}c^{-1}$), $P_{PhAR>0}$ – фотосинтез (мкмоль $CO_2 m^{-2}c^{-1}$) для всего диапазона ФАР, $P_{PhAR>1400}$ – фотосинтез в мкмоль $CO_2 m^{-2}c^{-1}$ для ФАР > 1400 мкмоль фотонов $m^{-2}c^{-1}$, R – дыхание (мкмоль $CO_2 m^{-2}c^{-1}$). *Отличия от исходного уровня (К) достоверны при $p \leq 0,05$.

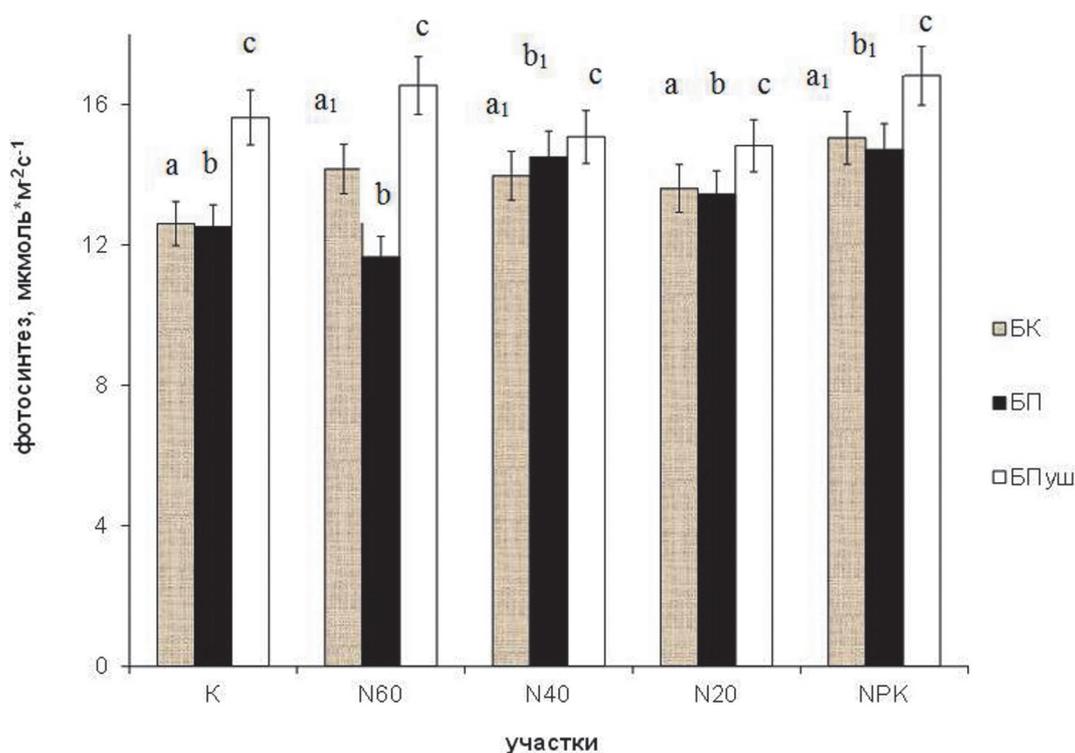
Note. $PhAR$ – photosynthetic active radiation (μmol photon $m^{-2}c^{-1}$), $P_{PhAR>0}$ – photosynthesis (μmol $CO_2 m^{-2}c^{-1}$) for the whole range of $PhAR$, $P_{PhAR>1400}$ – photosynthesis (μmol $CO_2 m^{-2}c^{-1}$) for $PhAR > 1400$ μmol photon $m^{-2}c^{-1}$, R – respiration (μmol $CO_2 m^{-2}c^{-1}$). *Statistically significant differences were set at $p \leq 0,05$.

верные различия в средних величинах ФАР – основного фактора, влияющего на фотосинтез. Сравнение проводилось только в том случае, если достоверность различий средних значений ФАР отсутствовала. Сравнение средних величин фотосинтеза проводили как для всего диапазона ФАР, так и для ФАР > 1400 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$, когда световая кривая фотосинтеза выходит на плато (табл. 1). Фотосинтез, как правило, достигает своих максимальных значений при ФАР 2000 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$. Такие высокие значения ФАР регистрируются при высокой прозрачности атмосферы и наличии небольшого количества облаков, отражение от которых вносит дополнительный вклад в освещенность. Обычно датчик, направленный на солнце, показывал ФАР в зависимости от времени суток, года, наличия облаков от 1400 до 1900 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$. Исследование световых кривых фотосинтеза у березы [Болондинский, Виликайнен, 2014] показало, что при значениях ФАР выше 1400 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$ фотосинтез достигал 90 ± 5 % от своих максимальных величин.

Исследования в контрольном секторе показали, что при ФАР > 0 и ФАР > 1400 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$ значимые различия средних величин фотосинтеза березы повислой и карельской березы отсутствовали (табл. 1). В наших предыдущих исследованиях, проводившихся на меньшем статистическом материале, всегда имелись небольшие, хотя и незначимые различия [Болондинский, Холопцева, 2013; Болондинский, Виликайнен, 2014]. В контрольном секторе было проведено более 700 измерений фотосинтеза. Это большое количество измерений дало почти полное совпадение средних значений фотосинтеза как для всего диапазона ФАР, так и для ФАР > 1400 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$ (табл. 1). Столь высокая точность совпадений средних величин фотосинтеза у двух форм березы повислой подтверждает бытующее в на-

стоящий момент мнение, что береза повислая и карельская береза являются одним видом. Не было различий и между максимальными значениями фотосинтеза, а также значениями темнового дыхания. У карельской березы значения фотосинтеза, превышающие 20 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$, наблюдали чаще, чем у березы повислой. Значимые различия в контрольном секторе были получены при сравнении березы пушистой с карельской березой и березой повислой ($p = 0,02$). При этом исследуемые деревья березы пушистой росли на северной границе сектора, самой бедной по содержанию азота.

Средние величины темнового дыхания мало различались у всех трех пород. Как и в прежних наших исследованиях [Болондинский, Виликайнен, 2014], максимальное по абсолютной величине темное дыхание было зафиксировано у карельской березы. Это наблюдалось как в контрольном, так и в других секторах. После внесения удобрения в секторе N60 величины дыхания выросли у всех пород на 10–12 %, а максимальные – на 60–70 % (табл. 1), что свидетельствовало об активизации обменных процессов в листьях. В секторе N60 при ФАР > 0 все различия в средних величинах фотосинтеза между породами были незначимы. При этом средняя величина фотосинтеза у березы пушистой была несколько выше (12,4 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$), чем у карельской березы (11,3 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$), а различия в максимальных величинах были еще выше – 29,4 и 24,4 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$ соответственно. При сравнении с контрольным сектором максимальные значения фотосинтеза двух форм березы повислой несколько снизились, а у березы пушистой выросли почти на 10 %. В секторе N60 при ФАР > 1400 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$ фотосинтез карельской березы превосходил фотосинтез березы повислой в среднем на 25 % ($p = 0,002$). Различия в ФАР были незначимыми ($p = 0,08$), то есть основной при-



Средние величины фотосинтеза в июле–августе 2013 г. у карельской березы – а (БК), березы повислой – b (БП) и березы пушистой – с (БПуш) в секторах К, N60, N40, N20, NPK при $\Phi AP > 1400$ $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Нижний индекс 1 указывает на достоверность различий ($p < 0,05$) средних значений фотосинтеза у контрольного и удобренного участка

Mean values of photosynthesis of *Betula pendula* var. *carelica* (БК), *Betula pendula* var. *pendula* (БП), and *Betula pubescens* (БПуш) in sectors K, N60, N40, N20 and NPK. $\Phi AP > 1400$ $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Subscript 1 indicates significant differences between mean values of photosynthesis in control and fertilized plots ($p < 0,05$)

чиной увеличения фотосинтеза у саженцев карельской березы явилось улучшение азотного питания. Значимые различия средних величин фотосинтеза березы повислой и карельской березы с березой пушистой в секторе N60 сохранились. У березы повислой реакция на удобрения была меньше как при $\Phi AP > 1400$ $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$, так и для всего диапазона ΦAP (рис.).

Внесение даже небольших доз азота стимулировало синтез хлорофилла и повышало эффективность работы единицы хлорофилла. Хл (a + b) вырос в секторе N60 по сравнению с контрольным сектором на 15,6 %. Как было показано ранее [Болондинский, Холопцева, 2013], при достаточном количестве азота в почве в жаркие дни мезофильная проводимость листьев карельской березы увеличивается в большей степени, чем у березы повислой, компенсируя снижение устьичной проводимости. Не исключено, что это явилось причиной большего увеличения фотосинтеза у карельской березы в секторе N60, где фотосинтез в некоторые дни был больше, чем у березы повислой. Это и отразилось на средних значе-

ниях. При снижении дозы вносимых азотных удобрений (сектора N20, N40) почти все эффекты, отмеченные для сектора N60, сохранялись. Средние значения фотосинтеза выросли по сравнению с контрольным сектором, хотя и в меньшей степени, чем в секторе N60. Различий между секторами N20, N40 и N60 найти не удалось, но значимые различия удобренных секторов с контрольным иногда фиксировались. Очень близкими к значимым ($p = 0,056$) оказались различия средних значений фотосинтеза у березы повислой для секторов N40 и N60 при $\Phi AP > 1400$ $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$, составляя соответственно 14,5 и 11,7 $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$. У карельской березы средние значения фотосинтеза при этом практически не различались, составляя 14,0 и 14,2 $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$ соответственно. Не исключено, что в секторе N60 значения фотосинтеза у карельской березы могли бы быть выше, если бы саженцы обладали такой же энергией роста, как и в других секторах. Они еще при посадке отставали в росте от других саженцев, и в дальнейшем этот разрыв увеличивался. То, что эффект влияния азота на фо-

тосинтез карельской березы проявился даже на таком материале, показывает важность влияния азотного питания при выращивании саженцев карельской березы, причем не только однолетних [Евдокимов, 1989].

Для секторов К и N40 были получены значимые различия как для карельской березы, так и для березы повислой. Для сектора N20 значимость различий с контрольным сектором подтвердить не удалось ($p = 0,058$). Отсутствие различий в средних величинах фотосинтеза у березы повислой в секторах К и N60 в целом неясны. У березы пушистой не удалось получить достоверных различий между контрольным и удобренными участками. В секторе N60 различия были близки к достоверным ($p = 0,05$), а в секторе NPK разница между контрольным сектором и удобренным вполне могла быть обусловлена различиями в освещенности ($p = 0,04$).

В 2014 г. в основном из-за погодных условий у всех видов берез максимальные и средние значения фотосинтеза были ниже, чем в 2013 г. С третьей декады июля и до конца августа в секторах N60 и NPK начиная с 13 часов наблюдали увеличивающуюся с каждым часом сильную полуденную депрессию фотосинтеза. Депрессия проявлялась и в других секторах, где вносились удобрения в меньшем количестве. Небольшое снижение (10–15 %) после 14 часов было зафиксировано и на контрольном участке, но оно мало отличалось от значений полуденной депрессии, которые наблюдали в предыдущие годы [Болондинский, 2010]. С 10 до 13 часов в секторе N60 на протяжении нескольких дней в конце июля фотосинтез фиксировался на уровне 11–14 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$, медленно увеличиваясь с утра до полудня. Темновое дыхание также медленно увеличивалось с 2–3 до 3–4 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$. В 13 часов фотосинтез начинал уменьшаться и к 15 часам составлял всего 2–3 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$, дыхание при этом возрастало на 1–2 мкмоль $m^{-2}c^{-1}$. Ранее у саженцев березы полуденная депрессия наблюдалась в природных условиях достаточно редко [Болондинский, 2010], в основном в периоды почвенной или атмосферной засухи. У саженцев, растущих в вегетационных сосудах или на хорошо удобренной почве с относительно высоким уровнем грунтовых вод, снижение фотосинтеза с 13 до 16 часов было незначительным [Болондинский, Виликайнен, 2014].

Осадки в течение июля–августа 2014 г. были достаточно частыми. Измерения влажности почвы в начале августа в трех секторах, где вносился азот, показали, что она была на 10–15 % ниже, чем в первую декаду июля, но намного

выше значений, которые приводят к устьичному ограничению фотосинтеза [Wang et al., 1998]. Полуденная депрессия наблюдалась как на верхних ветвях 3–5-метровых деревьев, так и на нижних, где она была особенно глубокой. Снижение фотосинтеза начиналось на нижних ветвях, а в течение 30–40 минут значительно уменьшался фотосинтез и на верхушечных побегах. Хотя в секторах N60 и NPK средние величины фотосинтеза на второй год внесения удобрений в целом оставались выше, чем в контрольном секторе, в августе проявилась тенденция снижения суточной продуктивности фотосинтеза по сравнению с контрольным участком. Поскольку на контрольном участке уменьшение фотосинтеза в послеполуденные часы было заметно меньше, чем в секторах N60 и NPK, суточная продуктивность фотосинтеза в солнечные теплые дни в контрольном секторе была выше, чем на удобренных участках. Оценка суточной продуктивности фотосинтеза для секторов К и NPK показала, что она снижалась примерно на 30 %, а в некоторые дни снижение превышало 50 %. В пасмурные дни суточная продуктивность фотосинтеза была выше на удобренных участках. Однако во второй год измерений общая площадь листьев кроны значительно повысилась у удобренных деревьев по сравнению с контрольными и дерево в целом поглощало больше углекислоты на удобренных участках в солнечные дни. Это отразилось на росте деревьев.

В годы внесения удобрений и последующие 2 года наблюдался усиленный рост всех видов берез. В 2016 г. средний диаметр на уровне 1,5 м у березы повислой в секторах N20, N40, N60, NPK вырос по сравнению с контрольным участком на 15, 20, 27, 30 %, а максимальная высота деревьев – на 40, 60, 70 и 120 % соответственно. Значительно возросла площадь листьев кроны. Все это привело к увеличению потребности растений в воде. Плотность деревьев, отдельные экземпляры которых достигли во второй год внесения удобрений высоты 5 м, была очень высокой (1,5 м между растениями). Корневая конкуренция за воду среди саженцев возросла. Часть влаги, особенно после кратковременных дождей, перехватывал быстро возобновляющийся травянистый покров.

Известно, что влияние удобрений ведет к усилению роста и дыхания корней [Зарубина, Коновалов, 2014; Лебедев, 2015]. Развитие более мощной корневой системы на удобренных участках благоприятно сказалось во время июньской засухи в первый год эксперимента. Не исключено, что на второй год возник некоторый дисбаланс в листо-корневых отношениях.

Таблица 2. Средние значения параметров моделей световых кривых фотосинтеза у карельской березы и березы повислой в секторах К и N60

Table 2. Mean values of parameters of the photosynthetic light-curves models of *Betula pendula* var. *carelica* and *Betula pendula* var. *pendula* in the control sector (K) and in the N60 sector

	a_1	b_1	b_2	r^2	I_{max}	R_{max}	P_{max}	СКП	tg
	мкмоль м ⁻² с ⁻¹			%	мкмоль м ⁻² с ⁻¹				
<i>Betula pendula</i> Roth. var. <i>carelica</i> , K									
M	-2,5	22,6	419,8	93,0	1574	-2,8	17,0	52,2	0,19·10 ⁻⁴
σ	0,6	2,4	101,8	6,5	203	-0,7	3,3	12,3	0,02·10 ⁻⁴
<i>Betula pendula</i> Roth. var. <i>carelica</i> , N60									
M	-3,6	26,7	308,9	97,6	1774	-3,4	18,5	48,1	0,37·10 ⁻⁴
σ	0,1	1,8	78,8	0,5	45	0,2	1,4	11,7	0,06·10 ⁻⁴
<i>Betula pendula</i> Roth. var. <i>pendula</i> , K									
M	-3,0	18,3	411,2	94,0	1729	-3,1	16,1	80,6	0,068·10 ⁻⁴
σ	1,0	4,6	127,1	4,2	183	1,4	4,3	21,4	0,01·10 ⁻⁴
<i>Betula pendula</i> Roth. var. <i>pendula</i> , N60									
M	-3,1	20,8	341,2	96,4	1479	-3,4	17,8	59,8	0,17·10 ⁻⁴
σ	1,3	2,9	107,0	3,5	685	0,9	3,8	17,6	0,02·10 ⁻⁴

Примечание. M, σ – средние значения и стандартные отклонения соответственно; a_1, b_1, b_2 – значения параметров моделей световых кривых; r^2 – коэффициент детерминации; $I_{max}, P_{max}, R_{max}$ – соответственно средние максимальные значения ФАР, фотосинтеза и дыхания в момент снятия световой кривой; СКП – световой компенсационный пункт; tg – тангенс угла наклона световой кривой в точке компенсационного пункта.

Note. M, σ – mean values and standard deviations respectively; a_1, b_1, b_2 – parameters of the photosynthetic light-response curve models; r^2 – coefficient of determination; $I_{max}, P_{max}, R_{max}$ – the mean maximal values of PhAR, photosynthesis and respiration, respectively; СКП – light compensation point; tg – the tangent of the light curve slope at the point of the compensation point.

По всей вероятности, ограничение поступления влаги в ствол в дневные часы было связано с тем, что запасы воды в зоне, непосредственно прилегающей к тонким корням, оказывались к полудню в значительной мере исчерпанными. Снижение фотосинтеза, вероятнее всего, было обусловлено заметным снижением устьичной проводимости. Далее, в течение вечерних и ночных часов запасы влаги в прикорневой зоне и стволе восполнялись, и в утренние часы устьица снова широко открывались на несколько часов. При этом интересно, что описанный эффект полуденной депрессии проявился именно на второй год внесения удобрений. Как пишут в своей книге Hagqvist и Mikkola [2008], обобщая опыт финских лесоводов: «...К внесению удобрений следует относиться с осторожностью. Внесение азотного удобрения два года подряд вызывает явную задержку роста на два года. Листья березы становятся светло-желтыми и остаются мелкими, особенно на малогумусных лесных почвах. Напротив, единичное внесение удобрения вызывает положительный эффект. Избыточное внесение азотных удобрений может стимулировать длительный осенний рост и повреждение ветвей морозом и даже растрескивание стволов зимой». Описанные эффекты в нашем эксперименте отсутствовали, за исключением того, что хорошо удобренные деревья действительно росли дольше контрольных и полностью сбрасывали листья при-

мерно на две недели позднее. Особенно это касалось карельской березы. Исследования на различных видах березы показывают, что в условиях водного стресса высокие величины почвенного азота могут ограничивать рост и другие физиологические процессы [Wendler, Millard, 1996; Wang et al., 1998]. Авторы предполагают, что в условиях высокого содержания азота в почве ограничение устьичной проводимости и фотосинтеза, возможно, связано с увеличением гидравлического сопротивления ствола.

Анализ параметров световых кривых фотосинтеза показал, что они достаточно изменчивы и зависят как от внешних факторов среды, так и от времени вегетации и состояния листа и растения. В ряде случаев это было связано с возрастом листа, а также со световыми условиями роста. Несмотря на разброс значений фотосинтеза даже при одной и той же освещенности, получаемый при снятии ряда световых кривых, коэффициенты детерминации (r^2) моделей были высокими (93–98 %). Параметр a_1 , характеризующий темновое дыхание листа у карельской березы в секторе N60, достоверно был выше, чем у контрольных растений (табл. 2). У березы повислой его рост относительно контроля был менее значительным. Более выраженным у карельской березы был рост параметра b_1 : с $22,7 \pm 2,4$ до $26,7 \pm 1,8$ мкмоль м⁻² с⁻¹. Данный параметр повышался с $18,3 \pm 4,6$

до $20,8 \pm 2,9$ мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ и у березы повислой, но не так существенно, как у березы карельской. Особый интерес представляют изменения константы насыщения световой кривой (b_2). В целом ее значения были велики, так как фотосинтетический аппарат листьев как у березы повислой, так и у карельской березы был адаптирован к высоким значениям ФАР (табл. 2).

После внесения удобрений у карельской березы параметр b_2 достоверно снизился с $419,0 \pm 101,8$ до $308,9 \pm 78,8$ мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, что дало возможность растениям более эффективно использовать низкую инсоляцию, особенно в ранние утренние часы, когда транспирационные расходы невелики и устьица полностью раскрыты.

Внесение удобрений увеличило использование малых доз солнечной радиации у всех видов, но особенно у карельской березы. Также наблюдалось уменьшение светового компенсационного пункта (СКП). Причем СКП уменьшился не за счет снижения темнового дыхания, как это часто происходит, а из-за увеличения угла наклона световой кривой, что прежде всего связано с активизацией обменных процессов в листе. Световой компенсационный пункт, рассчитанный по параметрам моделей световых кривых, снижался после внесения удобрений во всех секторах, но особенно в N60 и NPK. Средние значения СКП составили для 20 опытных саженцев в секторах К, N60 и NPK соответственно 116,6; 72,4 и 54,1 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. При этом как реальные средние значения темнового дыхания, так и значения параметра a_1 в секторе N60 и NPK были выше, чем в секторе К, что могло бы только увеличить СКП. Средние величины СКП у карельской березы и березы повислой составили соответственно в секторе К – 69 и 153, в секторе N60 – 49 и 86 и в секторе NPK – 47 и 54 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Это говорит о том, что эффективность работы фотосинтетического аппарата у карельской березы при низких значениях ФАР была существенно выше, чем у березы повислой, и эта эффективность возрастала при внесении минеральных удобрений. Рассчитанный тангенс угла наклона световой кривой для секторов К и NPK составил $0,19 \cdot 10^{-4}$ и $0,36 \cdot 10^{-4}$ мкмоль CO_2 (мкмоль квантов) $^{-1}$ соответственно, т. е. вырос примерно в два раза. В результате в диапазоне ФАР 20–200 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ мы имели для секторов N60 и NPK увеличение средних величин фотосинтеза на 50 %.

В пасмурную погоду низкие константы насыщения (b_2) получались, если лист с раннего утра находился при низкой освещенности. Если утро было солнечное, а затем набегали тучи и мы приступали к измерениям, настро-

енность фотосистемы на большую инсоляцию еще сохранялась и константа насыщения была достаточно высокой (150–200 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$). При низких значениях начальных уровней ФАР b_2 имел величины меньше 80 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Минимум b_2 у карельской березы составил 11 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, что менее 0,4 % от максимальных значений ФАР в нашем районе исследований. При этом на протяжении всего дня была очень низкая облачность, и фотосистема листа уже в утренние часы была настроена на эффективную работу при низкой инсоляции. Разумеется, при столь низких b_2 фотосинтез невысокий, но CO_2 -баланс листа оказывался в условиях низкой ФАР (40–50 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) практически всегда положительным. Значения параметра b_2 при этом были ощутимо меньше значений световых компенсационных пунктов, полученных в солнечную погоду. Одна из причин этого в том, что темновое дыхание было в такие дни очень низкое даже в теплый период.

Заключение

Проведенная сравнительная оценка CO_2 -газообмена у листьев 5–6-летних саженцев двух форм березы повислой (*Betula pendula* и *Betula pendula* var. *carelica*), выращиваемых при различных уровнях азотного питания, показала, что средние величины фотосинтеза и темнового дыхания, как правило, возрастали по мере увеличения количества вносимого удобрения. Были получены достоверные различия величин фотосинтеза у карельской березы по сравнению с контролем для секторов N40, N60 и NPK, а у березы повислой – для секторов N40 и NPK. Достоверного влияния внесения азота в почву на скорость фотосинтеза березы пушистой получить не удалось, но была зафиксирована тенденция ее увеличения в секторах N60 и NPK. Средние величины фотосинтеза у березы пушистой в контрольном секторе более чем на 20 % превышали таковые у двух форм березы повислой, и это превосходство сохранялось, хотя и в меньшей степени, при разных уровнях внесения азота. На большом статистическом материале на почве умеренного плодородия контрольного сектора показано практически полное отсутствие разницы в средних величинах фотосинтеза у карельской березы и березы повислой ($p = 0,97$). Это отсутствие различий сохранялось во всех других секторах, за исключением сектора N60.

По мере увеличения доз вносимого удобрения активизировались рост растений и их репродуктивная деятельность. Значительно увеличилась площадь листьев крон. Эти явле-

ния наблюдались уже в конце первого года измерений. На второй год внесения удобрений проявился целый ряд эффектов, в частности, полуденная депрессия фотосинтеза, особенно в секторах с высокими дозами вносимых удобрений. С 13 до 16 часов при отсутствии атмосферной засухи и при достаточной оводненности почвы происходило снижение фотосинтеза более чем в три раза. Одной из причин этого была очень высокая плотность посадки саженцев и усиливающаяся по мере их роста корневая конкуренция за почвенную влагу. В контрольном секторе во время интенсивного роста на протяжении 3–4 недель суточная продуктивность фотосинтеза в солнечные теплые дни была выше, чем в секторах N60 и NPK. В пасмурные дни с высокой относительной влажностью воздуха наблюдалось обратное явление.

Анализ параметров моделей световых кривых фотосинтеза показал, что внесение азота способствовало росту эффективности работы фотосинтетического аппарата. Получено достоверное снижение средних величин светового компенсационного пункта и константы насыщения у всех видов берез. Сдвиг светового компенсационного пункта в область низких значений ФАР, более высокая крутизна световых кривых дают возможность фотосинтетическому аппарату эффективнее использовать низкую освещенность в ранние утренние часы и пасмурные дни. Наиболее ярко это проявилось у карельской березы.

Внесение удобрений способствовало увеличению числа деревьев карельской березы с узорчатой древесиной, хотя выход таких экземпляров был крайне мал даже на хорошо удобренных участках. Большая часть деревьев карельской березы развивались по обычному пути, обгоняя в росте даже деревья березы повислой.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0220-2017-0002) и при финансовой поддержке РФФИ (грант 17-04-01087-а).

Литература

Болондинский В. К. Исследование зависимости фотосинтеза от интенсивности солнечной радиации, температуры и влажности воздуха у растений карельской березы и березы повислой // Труды КарНЦ РАН. 2010. № 2. С. 3–10.

Болондинский В. К., Виликайнен Л. М. Исследование световой зависимости фотосинтеза у карель-

ской березы и березы повислой в условиях разной обеспеченности элементами минерального питания // Труды КарНЦ РАН. 2014. № 5. С. 207–213.

Болондинский В. К., Холопцева Е. С. Исследования фотосинтеза и транспирации у карельской березы и березы повислой // Труды КарНЦ РАН. 2013. № 3. С. 173–178.

Евдокимов А. П. Биология культуры карельской березы. Л.: ЛГУ, 1989. 224 с.

Зарубина Л. В., Коновалов В. Н. Эколого-физиологические особенности ели в березняках черничных. Архангельск: САФУ, 2014. 378 с.

Лебедев Е. В. Фотосинтез, минеральное питание и биологическая продуктивность древостоев разных бонитетов сосны обыкновенной в Республике Беларусь в онтогенезе // Вестник РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности. 2015. № 4. С. 37–45.

Методическое руководство по ускоренному анализу золы растений и определению азота. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 1990. 45 с.

Паавилайнен Э. Применение минеральных удобрений в лесу: пер. с фин. М.: Лесн. пром-ть, 1983. 96 с.

Придача В. Б., Новичонок Е. В., Николаева Н. Н., Иванова Д. С., Сазонова Т. А. Влияние аммонийного азота на морфофизиологические показатели двух форм *Betula pendula* (Betulaceae) // Растительные ресурсы. 2018. Т. 54, № 2. С. 213–235.

Haqqvist R., Mikkola A. Visakoivun kasvatus ja käyttö. Metsäkustannus Oy, 2008. 168 s.

Hoogesteger J. Tree ring dynamics in mountain birch // Licentiate thesis, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Report from the Department of Crop Production Ecology (VPE) Swedish University of Agricultural Sciences (SLU) Uppsala, 2006. No. 5. P. 1–33.

Pridacha V. B., Bolondinskii V. K., Olchev A. V., Sazonova T. A. Structural and functional peculiarities of plants from the genus *Betula* L. at early stages of ontogenesis // Biol. Bull. 2017. Vol. 44, no. 2. P. 144–149. doi: 10.1134/S1062359017020157

Sellin A., Tullus A., Niglas A., Öunapuu E., Karusion A., Lohmus K. Humidity-driven changes in growth rate, photosynthetic capacity, hydraulic properties and other functional traits in silver birch (*Betula pendula*) // Ecol. Res. 2013. Vol. 28. P. 523–535. doi: 10.1007/s11284-013-1041-1

Wang J. R., Hawkins C. D., Letchford T. Photosynthesis, water and nitrogen use efficiencies of four paper birch (*Betula papyrifera*) populations grown under different soil moisture and nutrient regimes // Forest Ecol. Manag. 1998. Vol. 112. P. 233–244.

Wendler R., Millard P. Impacts of water and nitrogen supplies on the physiology, leaf demography and nitrogen dynamics of *Betula pendula* // Tree Physiol. 1996. Vol. 16. P. 153–159.

Поступила в редакцию 25.06.2018

References

Bolondinskii V. K. Issledovanie zavisimosti fotosinteza ot intensivnosti solnechnoi radiatsii, temperatury i vlazhnosti vozdukhа u rastenii karel'skoi berezy i berezy povisloi [Research of dependence of photosynthesis on the intensity of solar radiation, air temperature and humidity in Karelian (curly) birch and silver birch plants]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2010. No. 2. P. 3–10.

Bolondinskii V. K., Vilikainen L. M. Issledovanie svetovoi zavisimosti fotosinteza u karelskoi berezy i berezy povisloi v usloviyakh raznoi obespechennosti elementami mineral'nogo pitaniya [Research of photosynthesis light dependence in Karelian birch and common (silver) birch in different mineral nutrient availability settings]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2014. No. 5. P. 207–213.

Bolondinskii V. K., Kholoptseva E. S. Issledovaniya fotosinteza i transpiratsii u karel'skoi berezy i berezy povisloi [Research into the photosynthesis and transpiration in Karelian birch and silver birch]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2013. No. 3. P. 173–178.

Evdokimov A. P. Biologiya kul'tury karel'skoi berezy [Biology of Karelian birch culture]. Leningrad: LGU, 1989. 224 p.

Lebedev E. V. Fotosintez, mineral'noe pitanie i biologicheskaya produktivnost' drevostoev raznykh bonitetov sosny obyknovennoi v Respublike Belarus' v ontogeneze [Photosynthesis, mineral nutrition and biological productivity of pine stands of different yield class in the Republic of Belarus in ontogenesis]. *Vestnik RUDN. Ser. Ekol. i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti* [RUDN J. of Ecol. and Life Safety]. 2015. No. 4. P. 37–45.

Metodicheskoe rukovodstvo po uskorennomu analizu zoly rastenii i opredeleniyu azota [Methodical guide to the accelerated analysis of ash of plants and determination of nitrogen]. Petrozavodsk: KarRC RAS, 1990. 45 p.

Paavilaynen E. Primenenie mineral'nykh udobrenii v lesu [Use of mineral fertilizers in the forest]. Moscow: Lesn. prom., 1983. 96 p.

Pridacha V. B., Novichonok E. V., Nikolaeva N. N., Ivanova D. S., Sazonova T. A. Vliyaniye ammoniynogo azota na morfofiziologicheskie pokazateli dvukh form *Betula pendula* (Betulaceae) [Effects of ammonium nitrogen on morphophysiological parameters of two *Betula pendula* (Betulaceae) forms]. *Rastitel'nye resursy* [Plant Resources]. Vol. 54, no. 2. 2018. P. 213–235.

Zarubina L. V., Konovalov V. N. Ekologo-fiziologicheskie osobennosti eli v bereznyakakh chernichnyikh [Ecological and physiological features of spruce in blueberry birch forests]. Arkhangel'sk: SAFU, 2014. 378 p.

Hagqvist R., Mikkola A. Visakoivun kasvatus ja käyttö. Metsäkustannus Oy, 2008. 168 p. (in Finnish).

Hoogesteger J. Tree ring dynamics in mountain birch. *Licentiate thesis, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Report from the Department of Crop Production Ecology (VPE) Swedish University of Agricultural Sciences (SLU) Uppsala*. 2006. No. 5. P. 1–33.

Pridacha V. B., Bolondinskii V. K., Olchev A. V., Sazonova T. A. Structural and functional peculiarities of plants from the genus *Betula* L. at early stages of ontogenesis. *Biol. Bull.* 2017. Vol. 44, no. 2. P. 144–149. doi: 10.1134/S1062359017020157

Sellin A., Tullus A., Niglas A., Öunapuu E., Karusion A., Lõhmus K. Humidity-driven changes in growth rate, photosynthetic capacity, hydraulic properties and other functional traits in silver birch (*Betula pendula*). *Ecol. Res.* 2013. Vol. 28. P. 523–535. doi: 10.1007/s11284-013-1041-1

Wang J. R., Hawkins C. D., Letchford T. Photosynthesis, water and nitrogen use efficiencies of four paper birch (*Betula papyrifera*) populations grown under different soil moisture and nutrient regimes. *Forest Ecol. Manag.* 1998. Vol. 112. P. 233–244.

Wendler R., Millard P. Impacts of water and nitrogen supplies on the physiology, leaf demography and nitrogen dynamics of *Betula pendula*. *Tree Physiol.* 1996. Vol. 16. P. 153–159.

Received June 25, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Болондинский Виктор Константинович

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт леса КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: bolond@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 768160

Виликайнен Людмила Матвеевна

физик
Институт леса КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: vilikainen@mail.ru
тел.: (8142) 768160

CONTRIBUTORS:

Bolondinskii, Viktor

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

Vilikainen, Lyudmila

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

УДК 599.323.4:577.175:159.929

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОВЕДЕНИЯ И ТРЕВОЖНО-ФОБИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СВЕТОВОЙ ДЕПРИВАЦИИ И ЛУЗИНДОЛА

**Е. А. Хижкин^{1,2}, А. В. Гулявина², В. А. Илюха¹,
И. А. Виноградова², А. В. Морозов¹, Е. С. Брулер²**

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

² Петрозаводский государственный университет, Россия

Изучено влияние длительного содержания крыс в условиях специфического экстремального светового режима (световая депривация) и антагониста мелатониновых рецепторов лузиндола на возрастную динамику поведенческих реакций и психоэмоциональных проявлений. Уровень эмоционального и тревожно-фобического состояния животных оценивали в установке «Открытое поле» в сочетании с тестом «Темная камера с отверстиями». Установлено, что в процессе старения у крыс, содержащихся в стандартных световых условиях (LD), на фоне повышения тревожно-фобических реакций двигательная активность снижалась. Влияние длительного пребывания в условиях световой депривации на психоэмоциональное состояние и двигательную активность крыс различалось в зависимости от того, в какой период онтогенеза животные помещались в специфические условия. Возрастные изменения поведения характеризовались повышением уровня тревожности у стареющих и старых крыс, причем у животных, содержащихся в темноте с момента рождения (LD/DD), в большей степени, чем у крыс, находившихся в таких условиях с периода внутриутробного развития (DD/DD). Применение антагониста мелатониновых рецепторов лузиндола в условиях темноты приводило к возрастному усилению тревожно-фобического состояния на открытом пространстве (в тесте «Открытое поле»), однако оказывало нормализующий эффект на психоэмоциональное состояние крыс в установке «Темная камера с отверстиями», имитирующей естественное убежище животных. Сделан вывод о том, что мелатонинэргическая система, включающая эпифиз, мелатонин и его рецепторы, принимает непосредственное участие в регуляции поведения и психоэмоционального состояния крыс в специфических условиях освещения, которые зачастую являются экстремальными и могут наносить значительный вред здоровью организма.

К л ю ч е в ы е с л о в а: световая депривация; лузиндол; открытое поле; поведение; онтогенез; крысы.

**E. A. Khizhkin, A. V. Gulyavina, V. A. Ilyukha, I. A. Vinogradova,
A. V. Morozov, E. S. Bruler. AGE-RELATED CHANGES IN THE BEHAVIOR
AND PHOBIC ANXIETY REACTIONS IN RATS UNDER EXPOSURE TO LIGHT
DEPRIVATION AND LUZINDOLE**

The effect of both long-term stay of rats under the specific extreme conditions of light deprivation, and the administration of a melatonin receptor antagonist luzindole on the age-related pattern of behavioral reactions and psycho-emotional manifestations was stud-

ied. The level of the emotional and phobic anxiety state of the animals was assessed in an "Open field" installation in combination with the test "Dark chamber with holes". We found that in the process of aging, rats kept in standard light conditions (LD) demonstrated a decline in motor activity along with an increase in phobic anxiety reactions. The effect of a prolonged exposure to light deprivation on the psycho-emotional state and motor activity of rats varied depending on the ontogenetic period during which the animals were placed in these specific conditions. At an advanced age, the anxiety level increased in rats kept in the dark since birth (LD/DD) to a greater degree than in the animals exposed to such conditions since prenatal development (DD/DD). The administration of a melatonin receptor antagonist luzindole to animals kept in constant darkness led to an age-related increase in phobic anxiety in the open space (as shown in the "Open Field" test), but had a normalizing effect on the psycho-emotional state of the rats in the "Dark chamber with holes" installation, imitating the animals' natural shelter. It is concluded that the melatonergic system, including the pineal gland, melatonin and its receptors, is directly involved in the regulation of the behavior and psycho-emotional state of rats under specific lighting conditions, which are often extreme and harmful for their health.

Key words: light deprivation; luzindole; open field; behavior; ontogeny; rat.

Введение

Организм непрерывно подвергается воздействию различных внешних раздражителей, на изменение которых он отвечает определенными приспособительными реакциями. Одним из важнейших факторов, влияющих на жизнедеятельность организма – его физиологическое состояние и поведенческие процессы, является световой режим и его суточные и сезонные вариации. Регуляция функционирования организма при смене световых условий осуществляется циркадианной системой, в которой важная роль отводится нейроэндокринному органу – эпифизу и его гормону – мелатонину.

Мелатонин кодирует информацию о суточных ритмах освещения у млекопитающих, однако этим функции гормона в организме не ограничиваются. Было показано, что мелатонин вовлечен в регуляцию психоэмоциональных и психопатологических состояний у животных и людей. Наиболее распространенными психоэмоциональными расстройствами являются депрессивное, биполярное и сезонное аффективные расстройства. Поскольку они наблюдаются с определенной периодичностью, нарушения циркадных ритмов часто считаются одним из основных факторов рецидивов [Srinivasan et al., 2006]. Кроме этого изменения в секреции мелатонина были обнаружены при депрессии, болезни Альцгеймера и Паркинсона [Srinivasan et al., 2006], шизофрении [Sandyk et al., 1990] и других психиатрических заболеваниях [Pacchierotti et al., 2001]. Психоэмоциональные нарушения у животных характеризуются изменением прежде всего тревожно-фобических реакций. В лабораторных исследованиях было показано, что воздействие света в ночное вре-

мя снижало тревожноподобное поведение. Так, у грызунов отмечалось увеличение времени, проведенного в светлой камере, по сравнению с темной, в установке «Темно-светлая камера» и увеличение количества вертикальных стоек в установке «Открытое поле» [Russart, Nelson, 2018]. Несмотря на то что мелатонин играет важную роль в функционировании мозга, физиология его воздействия на этот орган до конца не понята. Существует мнение, что регуляция психоэмоционального состояния организма осуществляется посредством влияния мелатонина через мелатониновые рецепторы на гиппокамп, серотонинэргическую и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую системы [López-Figueroa et al., 2004; Savaskan et al., 2002, 2005].

У млекопитающих хронические циркадные нарушения имеют разнообразные негативные последствия для физического и психического здоровья [Karatsoreos et al., 2011; Karatsoreos, 2012]. В связи с тем, что развивающийся организм по сравнению со взрослым более чувствителен к изменениям окружающей среды [Connors et al., 2008; Leith, Carpenter, 2012; Bolton, Vilbo, 2014; Bronson, Bale, 2016], можно предположить, что развитие десинхроноза в период эмбриогенеза и на ранних стадиях постнатального онтогенеза должно оказать негативное влияние на нормальное развитие, а его последствия будут сохраняться во взрослой жизни. Кроме этого, поскольку разные системы развиваются гетерохронно, вероятно, что и время начала десинхроноза будет дифференциально влиять на различные физиологические и поведенческие реакции.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования являлось изучение воз-

растных изменений поведения и психоэмоционального статуса крыс при длительном влиянии световой депривации и антагониста мелатониновых рецепторов, воздействие которых началось на разных этапах онтогенеза.

Материалы и методы

Исследования выполнены на приборно-аналитической базе Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Экспериментальные животные и схема эксперимента

В исследовании крыс Вистар обоего пола, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино» (научно-производственное подразделение филиала Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова), содержали в стандартных условиях вивария Петрозаводского государственного университета при температуре воздуха 20 ± 2 °С. Животные получали гранулированный корм для грызунов и отстоянную водопроводную воду без ограничения.

Самок в период беременности поместили в стандартное освещение (12 часов свет/12 часов темнота) или в постоянную темноту (рис. 1). После рождения потомства самок вместе с приплодом из первой группы разделили на три подгруппы: первую оставили в тех же условиях (LD) – это были контрольные крысы, вторая в этих же световых условиях получала водный раствор лузиндола (LD+луз), а третья была перемещена в постоянную темноту (LD/DD). Самки вместе с потомством из второй группы были разделены на две подгруппы: первую оставили в том же световом режиме (DD/DD), а вторая получала водный раствор лузин-

дола (DD/DD+луз). Каждая подгруппа состояла из восьми животных. Общее количество крыс, участвовавших в эксперименте, составляло 40 штук.

Для приготовления раствора лузиндола (Bachem AG, Швейцария) 10 мг вещества растворяли в небольшом количестве 95% этанола и далее разбавляли до 1 л дистиллированной водой (конечная концентрация этанола < 0,1 %). Доза лузиндола составляла 0,22 мг/кг массы тела крысы. Контрольные крысы получали отстоянную водопроводную воду, содержащую 0,0001 % этанола. Готовый раствор лузиндола давали крысам с питьевой водой в ночное время четыре раза в неделю, начиная с пятимесячного возраста и до момента гибели животных.

Возрастную динамику поведенческих реакций, психоэмоциональных проявлений, уровень эмоционального и тревожно-фобического состояния крыс оценивали в установке «Открытое поле» в сочетании с тестом «Темная камера с отверстиями». Все выполняемые животными действия регистрировались при помощи визуального наблюдения. Тестирование проводилось ежемесячно – в группах LD, LD+луз, LD/DD и DD/DD с 14 месяцев, а в группе DD/DD+луз – с 12-месячного возраста.

Тестирование крыс в установке «Открытое поле»

Установка «Открытое поле» входит в перечень установок для выполнения психофармакологических тестов согласно приказу Минздрава России № 281 от 30.04.2013. Тест «Открытое поле» рекомендуется руководством по доклиническому изучению новых фармакологических препаратов для оценки поведения крыс и мышей и включен в список исследований по изучению нейрорепрессантной, антидепрессантной

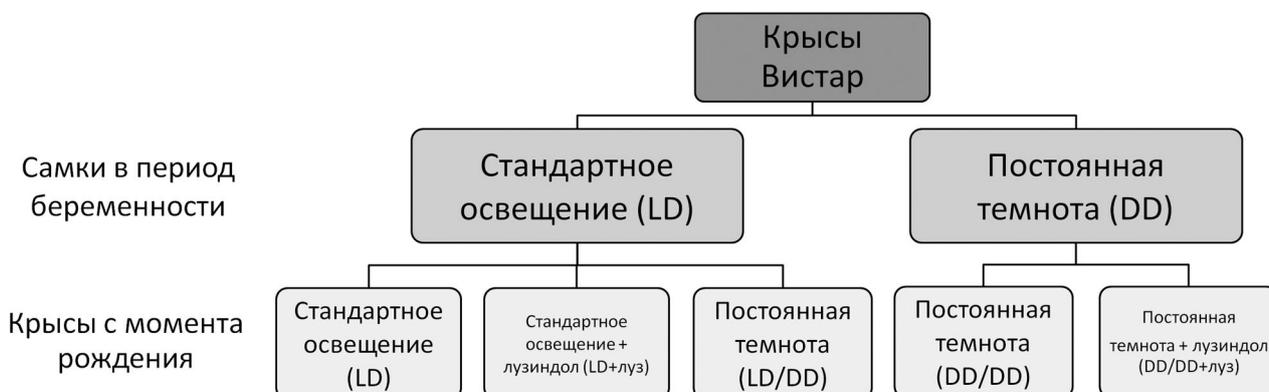


Рис. 1. Схема эксперимента

Fig. 1. Experiment design

и анксиолитической активности фармакологических веществ.

Регистрируемые показатели (формы поведения): горизонтальная двигательная активность (ГДА), вертикальная двигательная активность (ВДА), груминг, фризинг, обследование отверстий, количество дефекации и болюсов, количество уринаций.

Изучаемые показатели фиксировались в течение 1 и 3 минут нахождения животных в установке. После тестирования каждого животного арену протирали влажной губкой.

Тестирование крыс в установке «Темная камера с отверстиями»

Тест «Темная камера с отверстиями» используется как тест-предиктор индивидуального уровня эмоциональной реактивности и может служить источником дополнительной информации относительно анксиогенных/анксиолитических свойств исследуемых соединений.

Установка «Темная камера с отверстиями» имитирует укрытие с выходом в окружающее пространство, характерное для местообитаний грызунов. На время эксперимента камеру помещали в установку «Открытое поле» (для предотвращения убегания животного после выхода через боковое отверстие и одновременно для создания стабильной окружающей обстановки).

За четырехминутный период наблюдения регистрировали: латентный период первого заглядывания в верхнее (t_1 верх) и боковое (t_1 бок) отверстия, а также общее количество таких реакций (N верх и N бок соответственно). Кроме того, учитывали латентный период первого «полувыхода» (t_1 полувыход) и выхода (t_1 выход) животного, общее количество «полувыходов» (N полувыход) и полных выходов (N выход) / заходов (N вход) через боковое отверстие за тестовый период.

Статистическая обработка результатов

Полученные цифровые материалы обрабатывали с использованием пакетов статистических программ MS Excel и Statgraphics 2,0 общепринятыми методами вариационной статистики и представляли в виде $\text{mean} \pm \text{SEM}$. Достоверность различий между экспериментальными группами и крысами разных возрастов определяли непараметрическим критерием Вилкоксона – Манна – Уитни. Оценку влияния факторов на изучаемые показатели проводили с использованием многофакторного дисперсионного анализа.

Работа выполнена с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (2010/63/EU), «Биоэтических правил проведения исследований на человеке и животных», «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Санитарно-эпидемиологических требований к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», в соответствии с «Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях» [Этическая..., 2005].

Результаты

В тесте «Открытое поле» были получены результаты, отражающие влияние световых режимов и лузиндола на возрастную динамику поведенческих реакций (горизонтальная и вертикальная двигательная активность, обследование отверстий) и психоэмоциональных проявлений (фризинг, груминг, уровень уринаций и дефекаций) крыс. Проведение дисперсионного анализа показало, что среди факторов, способных оказать влияние на поведение животных (возраст, световой режим и препарат), в нашем эксперименте наибольшее влияние оказывал фактор «возраст» (рис. 2). В процессе старения значительно изменялись следующие показатели: ГДА за три минуты теста, ВДА, реакция фризинга и обследование крысами отверстий в полу арены. Максимальное влияние возраста отмечено для вертикальной двигательной активности крыс в первую минуту тестирования – 54,1 % ($F = 38,5$; $p = 0,0000$). Влияние фактора «свет» наблюдалось для вертикальной двигательной активности за одну минуту тестирования и реакции фризинга, а фактора «препарат» – для горизонтальной двигательной активности за одну минуту тестирования, уровня дефекаций в течение трех минут теста и количества болюсов. В связи с этим можно утверждать, что световые режимы в большей степени оказывают воздействие на поведенческие реакции, а применение антагониста мелатониновых рецепторов лузиндола – на психоэмоциональные проявления.

Как горизонтальная, так и вертикальная двигательная активность отражают уровень исследовательского поведения. Нами было установлено, что с возрастом во всех световых режимах происходит снижение исследовательской активности как за одну, так и за три минуты тестирования (рис. 3, А). У стареющих и старых крыс

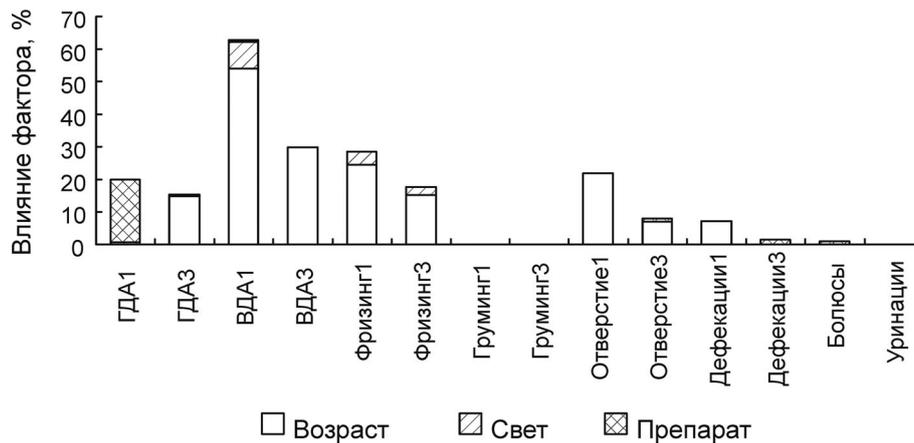


Рис. 2. Влияние изучаемых факторов на показатели поведения и психоэмоционального статуса крыс в тесте «Открытое поле» (по данным многофакторного дисперсионного анализа):

ГДА – горизонтальная двигательная активность; ВДА – вертикальная двигательная активность; фризинг – количество реакций замирания животного; груминг – число умываний; отверстие – количество обследованных отверстий в полу арены; дефекации – количество актов дефекации; болюсы – количество болюсов за все время теста; уринации – количество уринаций; цифры 1 и 3 – количество поведенческих актов за первую и за три минуты теста соответственно.

Fig. 2. The influence of factors on the behavior and psychoemotional status in rats in the Open field test (according to multifactor analysis of variance):

HLA (ГДА) – horizontal locomotor activity; VLA (ВДА) – vertical locomotor activity; freezing – the number animal crouching; grooming – the number of cleanings; hole – the number of holes surveyed in the arena floor; defecation – the number of acts of defecation; boluses – the number of boluses during testing; urinations – the number of urinations; symbols 1 and 3 – the number of behavioral acts for the first and three minutes of testing, respectively

(19–27 месяцев), матери которых содержались в постоянной темноте в период беременности (DD/DD), активность за три минуты теста была несколько выше по сравнению с контрольными животными и соответствовала активности молодых 14-месячных крыс в группе LD.

Реакция фризинга отражает уровень тревожности животных. В литературе экзогенный мелатонин, а также манипуляции, приводящие к возрастанию его уровня в организме, рассматриваются как седативное средство [Taria-Osorio et al., 2013]. Однако в наших исследованиях было показано, что молодые крысы, содержащиеся в темноте, независимо от того, в какой период онтогенеза их поместили в этот световой режим, имели гораздо более высокий уровень тревожности, чем контрольные животные (рис. 3, Б). Вероятно, такая реакция крыс на отсутствие освещения связана не с влиянием мелатонина как гормона, оказывающего успокаивающий эффект, а с изменением периодичности его синтеза, что, безусловно, является стрессорным фактором. Аналогичная картина наблюдается и в количестве актов дефекации (рис. 4). Уровень тревожности крыс, оцененный по этому показателю, был самым высоким в группе LD/DD.

Эффекты лизиндола обусловлены антагонистическим действием на мелатониновые рецепторы. В связи с этим его применение в норме должно негативно сказываться на психоэмоциональном состоянии крыс. В нашем эксперименте у крыс, получавших в ночное время лизиндол как в стандартных световых условиях, так и при световой депривации, было отмечено повышение уровня тревожности – увеличение количества реакций фризинга (рис. 3, Б). При этом, если в группе LD+луз чаще «замирали» старые крысы (19–24 месяцев), то в группе DD/DD+луз – молодые половозрелые и стареющие животные (14–18 месяцев).

Тестирование животных в установке «Темная камера с отверстиями» позволяет экспериментально провести оценку на предпочтение животными темноты или света, а также уровень их эмоциональной реактивности. Многофакторный дисперсионный анализ полученного цифрового материала показал, что, как и в случае с тестом «Открытое поле», фактор «возраст» оказывал значительное влияние на изучаемые показатели. Максимальные изменения в процессе старения крыс были отмечены для общего числа заглядываний в верхние отвер-

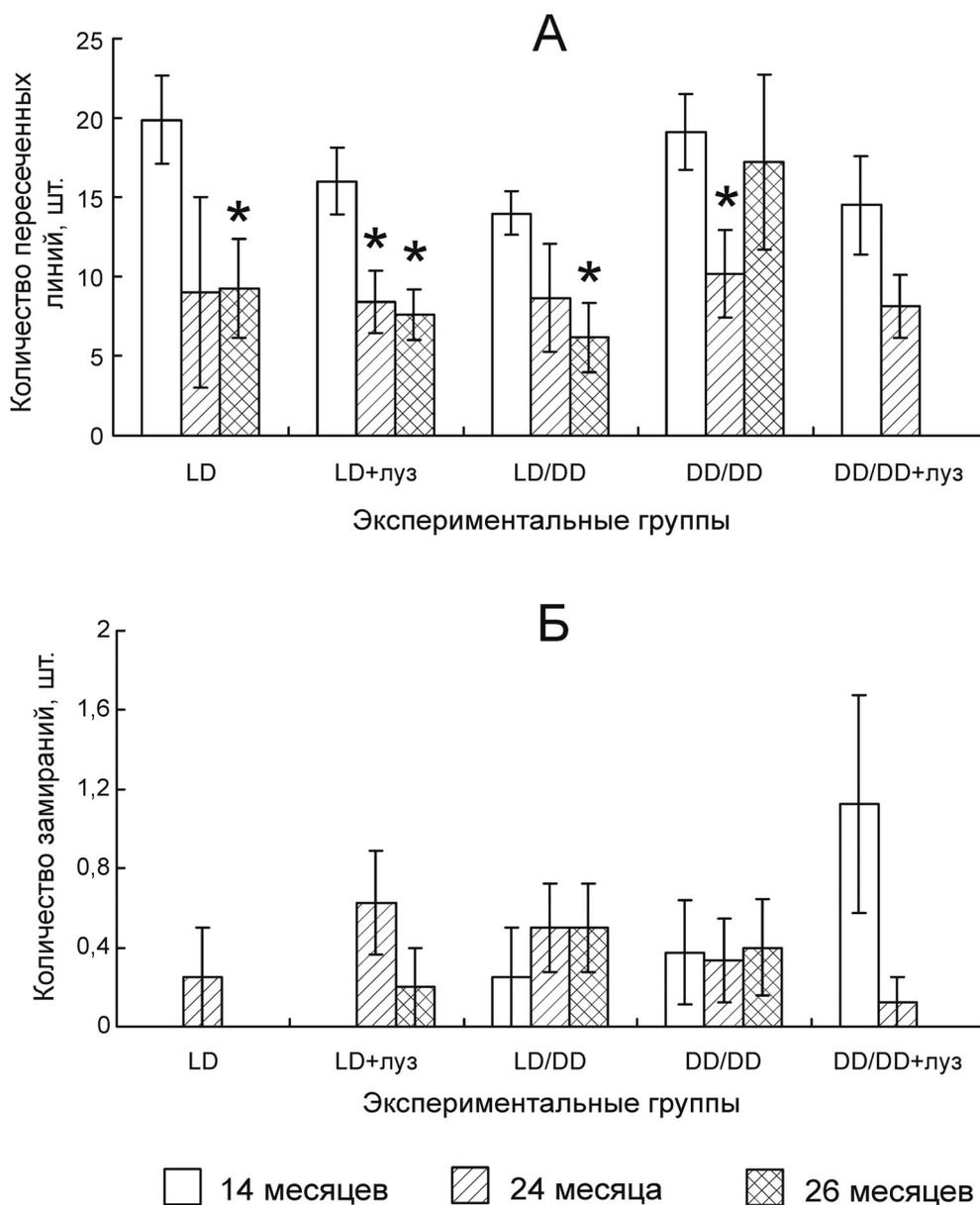


Рис. 3. Влияние световых режимов и лузиндола на горизонтальную двигательную активность (А) и реакцию фризинга (Б) молодых (14 месяцев) и старых (24 и 26 месяцев) крыс.

Здесь и на рис. 4 и 6: LD – группа крыс, содержащихся при стандартном освещении (контрольная группа); LD+луз – группа крыс, содержащихся при стандартном освещении и получавших лузиндол; LD/DD – группа крыс, пересаженных с момента рождения из стандартного освещения в постоянную темноту; DD/DD – группа крыс, оставленных после рождения в постоянной темноте; DD/DD+луз – группа крыс, оставленных после рождения в постоянной темноте и получавших лузиндол; * – различия достоверны по сравнению с молодыми животными ($p < 0,05$)

Fig. 3. The influence of the light regimes and luzindole on horizontal locomotor activity (A) and freezing reaction (B) of young and old rats.

Here and in Fig. 4, 6: LD – a group of rats that were kept under standard lighting (control group); LD+luz – a group of rats kept under standard lighting and treated with luzindole; LD/DD – a group of rats displaced since birth from standard lighting to constant darkness; DD/DD – a group of rats left after birth in constant darkness; DD/DD+luz – a group of rats left after birth in constant darkness and treated with luzindole; * – the differences are significant compared with young animals ($p < 0.05$)

ствия (N верх). Дисперсия данного показателя на 51,91 % ($F = 35,73$; $p = 0,0000$) определяется фактором «возраст». В меньшей степени воз-

раст оказывал влияние на другие показатели (рис. 5). Что касается других факторов, то их эффекты были незначительны.

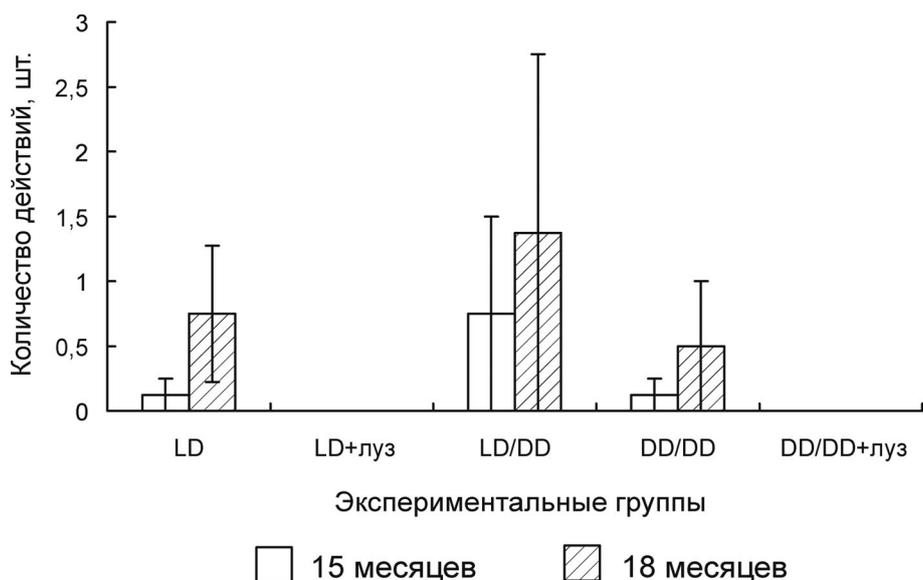


Рис. 4. Влияние световых режимов и лизиндола на количество актов дефекации у молодых и стареющих крыс

Fig. 4. Effect of light regimes and luzindole on the number of defecation acts in young and aging rats

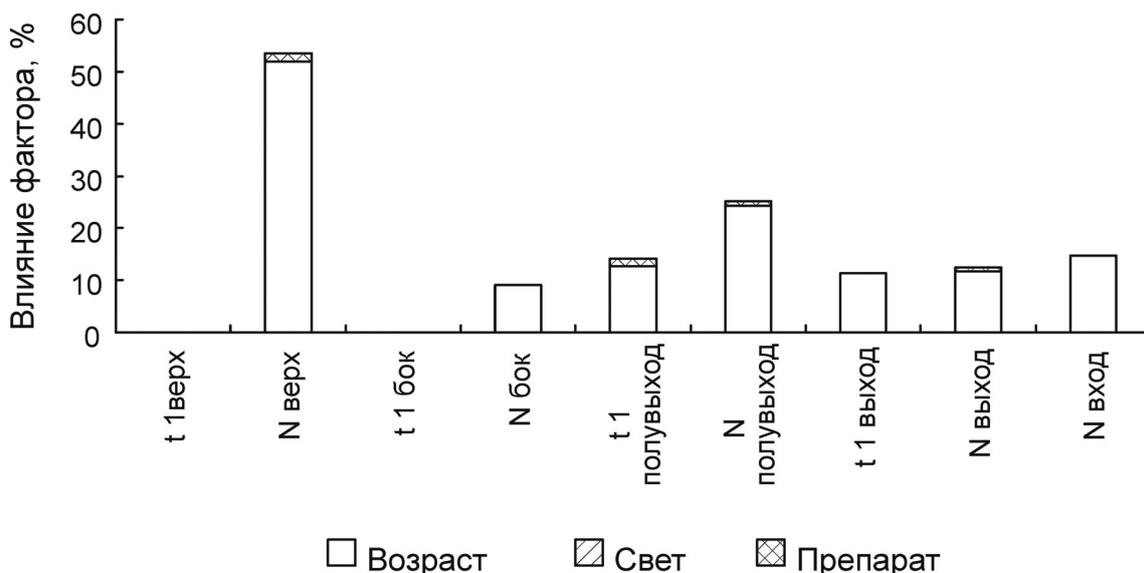


Рис. 5. Влияние изучаемых факторов на показатели поведения и психоэмоционального статуса крыс в тесте «Темная камера с отверстиями» (по данным многофакторного дисперсионного анализа).

Условные обозначения – см. раздел «Материалы и методы»

Fig. 5. The influence of the studied factors on the indicators of behavior and psychoemotional status in rats in the "Dark chamber with holes" test (according to multifactor analysis of variance).

Legend: see the chapter *Materials and methods*

Одним из показателей уровня тревожности и комфорта крыс является латентный период первого выглядывания из бокового отверстия. Исследование показало, что световая депривация по-разному влияла на время первого выглядывания из бокового отверстия. Кроме того, данный показатель зависел от того, в какой пе-

риод онтогенеза начиналось воздействие темноты (рис. 6). В группе LD/DD молодые животные чувствовали себя более комфортно, чем стареющие и старые, так как у первых значения изучаемого показателя были сходны с таковым у контрольных и с возрастом повышались. В группе DD/DD, напротив, старые животные

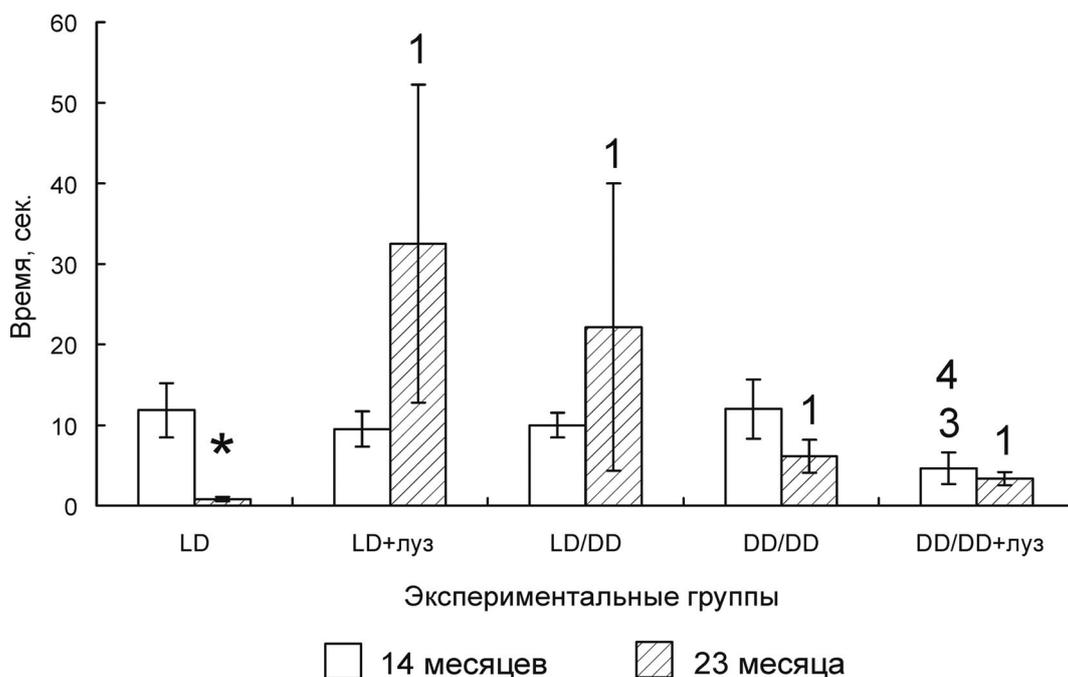


Рис. 6. Влияние световых режимов и лузиндола на время первого выглядывания молодых и старых крыс в боковое отверстие в тесте «Темная камера с отверстиями»:

1 – различия достоверны по сравнению с крысами того же возраста в группе LD; 3 – различия достоверны по сравнению с крысами того же возраста в группе LD/DD; 4 – различия достоверны по сравнению с крысами того же возраста в группе DD/DD

Fig. 6. The influence of light regimes and luzindole on the time of the first peeping into the side hole in the “Dark chamber with holes” test in young and old rats:

1 – the differences are significant compared with rats of the same age in the LD group; 3 – the differences are significant compared with rats of the same age in the LD/DD group; 4 – the differences are significant compared with rats of the same age in the DD/DD group

чувствовали себя комфортнее, чем молодые (т. к. в некоторых случаях время первого выглядывания с возрастом понижалось до того, которое наблюдали в группе LD).

Эффекты антагониста мелатониновых рецепторов лузиндола зависели от светового режима, в котором содержались крысы (рис. 6). У животных, получавших препарат в стандартном световом режиме (LD+луз), лузиндол повышал состояние дискомфорта, а возрастные изменения латентного периода первого выглядывания в боковое отверстие характеризовались «зигзагообразной» кривой. В отличие от этого в условиях световой депривации лузиндол (DD/DD+луз) снижал уровень тревоги, о чем свидетельствует уменьшение времени, затраченного молодыми половозрелыми животными (12–18 месяцев) на первое выглядывание в боковое отверстие. В дальнейшем при старении кривая латентного периода первого выглядывания в боковое отверстие у крыс в DD/DD+луз-группе изменялась незначительно.

Таким образом, ограничение открытого пространства установкой «Темная камера с отверстиями» позволила нам оценить уровень ком-

форта животных. Крысы, получавшие лузиндол при стандартном освещении, по сравнению контрольными животными в этом режиме и животными, получавшими препарат в темноте, гораздо реже проявляли желание выйти на свободное пространство через боковое отверстие, а возрастная кривая латентного периода первого выглядывания из бокового отверстия имела скачкообразный характер. В отличие от этого лузиндол в условиях световой депривации стабилизировал психоэмоциональное состояние крыс. Латентный период первого выглядывания в боковое отверстие у молодых половозрелых животных этой группы был значительно меньше, чем у контрольных и содержавшихся в темноте, но не получавших препарат антагониста мелатониновых рецепторов крыс.

Обсуждение

При изучении поведения и психоэмоционального статуса крыс в различных световых условиях установлены возрастные особенности реагирования животных на экстремальные условия освещения и на применение антаго-

ниста мелатониновых рецепторов. Ежемесячное тестирование крыс показало, что в условиях стандартного освещения (LD; контрольная группа) с течением времени происходило достоверное снижение исследовательского поведения (горизонтальной и вертикальной двигательной активности, обследования отверстий в полу арены) независимо от длительности наблюдения (одна или три минуты), уменьшалось количество реакций фризинга и актов дефекаций. Подобные результаты были получены нами и ранее [Виноградова, 2006] при изучении влияния на психоэмоциональные проявления и двигательную активность крыс различных световых режимов, воздействие которых началось с 1-месячного возраста. В этом исследовании при стандартном освещении на фоне возрастного снижения двигательной активности было отмечено повышение количества реакций фризинга. По нашему мнению, такая реакция животных на помещение в установку «Открытое поле» приводила к возникновению в ранние возрастные периоды исследовательского поведения, которое при старении крыс подавлялось развитием и усилением фобического состояния. Результаты настоящего исследования показывают, что возрастное снижение исследовательского поведения на фоне понижения тревожно-фобических реакций может быть следствием привыкания крыс к условиям тестирования и самой арене. Аналогичная закономерность была выявлена в работе В. Н. Анисимова и коллег [2001] – двигательная и исследовательская активность животных с возрастом уменьшались.

Известно, что световой режим, в котором проходят развитие плода и начальные стадии постнатального развития, предопределяет дальнейшие траектории формирования функциональных систем и процессов жизнедеятельности организма [Reiter et al., 2014]. В нашем исследовании влияние световой депривации на психоэмоциональное состояние и двигательную активность крыс различалось в зависимости от момента начала ее воздействия. Так, например, крысы, матери которых содержались в условиях темноты в период беременности (группа DD/DD), отличались высоким уровнем исследовательской активности, которая даже возрастала в процессе старения. В отличие от этих животных у крыс, находившихся в темноте с момента рождения (группа LD/DD), и ГДА, и ВДА были минимальными среди всех групп животных.

Поведение животных зачастую связано с их психоэмоциональным статусом [Серая..., 1990]. Тестирование в установке «Открытое

поле» позволило нам не только оценить уровень исследовательского поведения, но и выявить состояние тревожности и условия комфортного пребывания животных. В нашем эксперименте показано, что, наряду с наблюдавшимся у крыс в группе DD/DD повышением исследовательской активности, животные чувствовали себя комфортнее и их уровень тревожности был ниже, чем у крыс в LD/DD условиях освещения. Об этом свидетельствуют более низкие значения количества реакций фризинга и актов дефекаций у крыс в DD/DD-группе по сравнению с LD/DD. Вероятно, отмеченные эффекты DD/DD светового режима связаны с более длительным воздействием темноты и высоким уровнем мелатонина как у самок в период беременности, так и у их потомства. Исследования, проведенные на грызунах, показали, что нарушение циркадианного ритма у самок в период беременности изменяет поведенческие циркадные ритмы у потомства [Connors et al., 2008; Reiter et al., 2014]. Так, пинеалэктомия беременных самок значительно нарушает ритм потребления воды у потомства, который восстанавливается при регулярных инъекциях мелатонина в конце беременности самок.

Более 40 лет назад благодаря открытию гипнотических свойств мелатонина эпифиз был назван «успокаивающим органом» [Romijn, 1978]. Было показано, что дозы до 100 мг/кг приводили к значительному снижению локомоторной активности у хомячков [Golombek et al., 1991], однако эффект зависел от времени суток [Romijn, 1978] и был максимальным в течение ночи. Мелатонин проявлял седативную активность в экспериментах на крысах [Holmes, Sugden, 1982; Wurtman, Lieberman, 1985; Mirmiran, Pevet, 1986], кошках [Marczynski, Yamaguchi, 1964] и мышах [Sugden, 1983], однако эти исследования не учитывали суточную вариабельность чувствительности к гормону. В 1983 году Дж. Р. Редмен и коллеги [Redman et al., 1983] показали, что ритм активности крыс, содержащихся в постоянном тусклом свете, может быть синхронизирован ежедневными инъекциями мелатонина (1 мг/кг), что свидетельствует об имитации гормоном наступления темноты. Аналогичный дозозависимый синхронизирующий эффект, который реализовался посредством влияния мелатонина на супрахиазматическое ядро, у крыс был получен в условиях постоянного освещения [Cassone et al., 1986a, b]. Пинеалэктомия крыс при постоянном освещении приводила к моментальной дезорганизации циркадианного ритма активности, который восстанавливался после перемещения животных в условия световой депривации

[Cassone, 1992]. Изучение поведенческих реакций крыс в наших предыдущих исследованиях [Виноградова, 2006] показало, что содержание животных в условиях световой депривации (DD) сопровождалось в первые месяцы онтогенеза максимальными показателями двигательной активности за первую минуту тестирования как по количеству вертикальных стоек, так и по количеству пересеченных квадратов. С возрастом эти показатели уменьшались. Количество крыс, проявлявших реакцию фризинга, постепенно увеличивалось в процессе старения до 100 %. Психоэмоциональные реакции в виде вокализации у крыс в DD, по сравнению с животными в других световых режимах, практически не отмечались.

Установлено, что у взрослых млекопитающих хроническое нарушение циркадных ритмов имеет разнообразные негативные последствия для физического и психического здоровья [Karatsoreos et al., 2011; Karatsoreos, 2012], включая снижение продолжительности жизни [Froy, 2011]. Поскольку развивающийся организм чувствителен к нарушениям окружающей среды [Connors et al., 2008; Leith, Carpenter, 2012; Bolton, Bilbo, 2014; Bronson, Bale, 2016], хроническое нарушение циркадных ритмов оказывает негативное влияние на нормальное развитие, последствия которого будут сохраняться во взрослой жизни. Кроме того, поскольку разные системы развиваются гетерохронно в онтогенезе, хроническое нарушение циркадных ритмов может дифференцированно влиять на различные физиологические функции и поведенческие проявления. Эффекты хронического нарушения циркадных ритмов зависят от стадии развития, на которой оно происходит. При нарушениях во время внутриутробного развития возникают более выраженные поведенческие изменения у взрослого потомства, независимо от состояния новорожденных или матери. В исследованиях Б. Р. Смарра и коллег [Smarr et al., 2017] показано, что циркадные нарушения на ранних стадиях жизни влияют на дальнейшую жизнедеятельность организма. Наши результаты подтверждают эту закономерность и свидетельствуют о том, что циркадные нарушения на ранних стадиях онтогенеза могут оказывать аддитивное влияние в последующем, когда организм попадает в условия нарушенного светового режима. Кроме того, взаимодействие циркадных ритмов матери и собственных ритмов потомства на ранних стадиях онтогенеза играет важную роль в регуляции нормального развития.

Многие свои функции в организме мелатонин реализует посредством взаимодействия

с рецепторами. Известно, что гормон способен оказывать значительное влияние на спонтанное поведение и депрессивные проявления через МТ1-рецептор. Помимо этого, мелатонин-опосредованный сигнальный путь через МТ1-рецептор инициирует передачу информации о фотопериоде и регулирует поведенческие, сезонные и репродуктивные реакции поведения у хомячков [Weaver et al., 2004; Prendergast, Zucker, 2016]. В последних исследованиях [Martina et al., 2017] было показано, что мыши с нарушениями в мелатонинергической системе (дефицит мелатонина или отсутствие мелатониновых рецепторов) не имеют явных дефектов ритмов поведения. Тем не менее авторы работы отмечают, что мелатонин-дефицитные мыши (C57Bl), а также мыши с повышенным синтезом мелатонина, но с недостатком мелатониновых рецепторов (C3H), воспроизводят свои суточные двигательные ритмы со значительно меньшей точностью, чем мыши с нормальной мелатонинергической системой. Эти результаты доказывают, что одной из функций эндогенной мелатонинергической системы может быть стабилизация внутренних ритмов в измененных световых условиях.

Одним из физиологических способов выявления эффектов мелатонина является использование в экспериментах его антагонистов. В нашем исследовании лузиндол практически не оказывал влияния на возрастные изменения двигательной активности, но в значительной степени изменял реакции на тревожно-фобические стимулы как в тесте «Открытое поле», так и в установке «Темная камера с отверстиями». Влияние лузиндола на возрастные изменения поведенческих реакций и психоэмоциональных проявлений различалось в зависимости от светового режима, в котором содержались крысы, и от типа тестирования. Применение антагониста мелатониновых рецепторов лузиндола в условиях темноты приводило к возрастному усилению состояния тревожности крыс (по количеству реакций фризинга) на открытом пространстве (в тесте «Открытое поле»), однако оказывало нормализующий эффект на психоэмоциональное состояние крыс в установке «Темная камера с отверстиями», имитирующей естественное убежище животных. В группе LD+луз в «Открытом поле» чаще «замирали» стареющие крысы (18–23 месяцев), а в группе DD/DD+луз – молодые половозрелые животные (14–17 месяцев). Влияние лузиндола в стандартном освещении было сходно с эффектами постоянного освещения в исследовании И. А. Виноградовой [2006]. Содержание в условиях постоянного освещения с месячного возраста приводило к повышению

уровня тревоги крыс в тесте «Открытое поле». Также было показано, что содержание беременных мышей и крыс в условиях постоянного освещения приводит к значительному возрастанию тревожноподобного поведения [Roman, Karlsson, 2013; Vilches et al., 2014] и оказывает негативное влияние на метаболические процессы у потомства в зрелом возрасте [Torres-Farfan et al., 2004; Varcoe et al., 2011, 2013; Spichiger et al., 2015].

Заключение

Таким образом, при изучении влияния длительного содержания в условиях специфического экстремального светового режима (световая депривация) и антагониста мелатониновых рецепторов лузиндола на возрастную динамику поведенческих реакций (горизонтальная и вертикальная двигательная активность, обследование отверстий) и психоэмоциональных проявлений (фризинг, груминг, уровень уринаций и дефекаций и показатели теста «Темная камера с отверстиями») крыс показано, что мелатонинергическая система, включающая эпифиз, мелатонин и его рецепторы, принимает непосредственное участие в регуляции поведения и психоэмоционального состояния крыс.

В результате проведенного эксперимента установлено, что у крыс, содержащихся в стандартных световых условиях, локомоторная и исследовательская активность снижалась в процессе старения, а тревожно-фобические реакции были максимальными у стареющих крыс. Влияние длительного пребывания в условиях световой депривации на психоэмоциональное состояние и двигательную активность крыс различалось в зависимости от того, в какой период онтогенеза животные помещались в экспериментальные условия. Возрастные изменения поведения характеризовались повышением уровня тревожности у стареющих и старых крыс, причем у животных, содержащихся в темноте с момента рождения (LD/DD), в большей степени, чем у крыс, находившихся в таких условиях с периода внутриутробного развития (DD/DD).

Влияние лузиндола на поведенческие реакции различалось в зависимости от того, в условиях какого светового режима применялся препарат, – в условиях темноты антагонист мелатониновых рецепторов оказывал нормализующий эффект на психоэмоциональное состояние крыс.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального

бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0221-2017-0052).

Литература

Анисимов В. Н., Хавинсон В. Х., Заварзина Н. Ю., Забежинский М. А., Зимина О. А., Попович И. Г., Штылик А. В., Арутюнян А. В., Опарина Т. И., Прокопенко В. М. Влияние пептида эпифиза на показатели биологического возраста и продолжительность жизни мышей // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2001. Т. 87, № 1. С. 125–135.

Виноградова И. А. Сравнительное изучение влияния различных режимов на психоэмоциональные проявления и двигательную активность у крыс // Вестник НГУ. Сер. Биология, клиническая медицина. 2006. Т. 4, вып. 2. С. 69–77.

Серая крыса: Систематика, экология, регуляция численности. М.: Наука, 1990. 456 с.

Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации / Ред. Ю. Б. Белоусова. Москва, 2005. 156 с.

Bolton J. L., Bilbo S. D. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms // Dialogues Clin. Neurosci. 2014. Vol. 16. P. 307–320.

Bronson S. L., Bale T. L. The placenta as a mediator of stress effects on neurodevelopmental reprogramming // Neuropsychopharmacol. 2016. Vol. 41, no. 1. P. 207–218. doi: 10.1038/npp.2015.231

Cassone V. M., Chesworth M. J., Armstrong S. M. Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin // J. Biol. Rhythms. 1986a. Vol. 1, no. 3. P. 219–229. doi: 10.1177/074873048600100304

Cassone V. M., Chesworth M. J., Armstrong S. M. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic supra- and subchiasmatic nuclei // Physiol. Behav. 1986b. Vol. 36, no. 6. P. 1111–1121. doi: 10.1016/0031-9384(86)90488-9

Cassone V. M. The pineal gland influences rat circadian activity rhythms in constant light // J. Biol. Rhythms. 1992. Vol. 7, no. 1. P. 27–40. doi: 10.1177/074873049200700103

Connors S. L., Levitt P., Matthews S. G., Slotkin T. A., Johnston M. V., Kinney H. C., Johnson W. G., Dailey R. M., Zimmerman A. W. Fetal mechanisms in neurodevelopmental disorders // Pediatr. Neurol. 2008. Vol. 38, no. 3. P. 163–176. doi: 10.1016/j.pediatr-neurol.2007.10.009

Froy O. Circadian rhythms, aging, and life span in mammals // Physiology. 2011. Vol. 26, no. 4. P. 225–235. doi: 10.1152/physiol.00012.2011

Golombek D. A., Escobar E., Cardinali D. P. Melatonin-induced depression of locomotor activity in hamsters: time dependency and inhibition by the central type benzodiazepine antagonist Ro 15–1788 // Physiol. Behav. 1991. Vol. 49, no. 6. P. 1091–1098. doi: 10.1016/0031-9384(91)90336-M

Holmes S. W., Sugden D. Effects of melatonin on sleep and neurochemistry in the rat // Br. J. Phar-

macol. 1982. Vol. 76, no. 1. P. 95–101. doi: 10.1111/j.1476-5381.1982.tb09194.x

Karatsoreos I. N., Bhagat S., Bloss E. B., Morrison J. H., McEwen B. S. Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. Vol. 108, no. 4. P. 1657–1662. doi: 10.1073/pnas.1018375108

Karatsoreos I. N. Effects of circadian disruption on mental and physical health // Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 2012. Vol. 12, no. 2. P. 218–225. doi: 10.1007/s11910-012-0252-0

Leith S. J., Carpenter D. O. Special vulnerability of children to environmental exposures // Rev. Environ. Health. 2012. Vol. 27, no. 4. P. 151–157. doi: 10.1515/reveh-2012-0024

López-Figueroa A. L., Norton C. S., López-Figueroa M. O., Armellini-Dodel D., Burke S., Akil H., López J. F., Watson S. J. Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia // Biological Psychiatry. 2004. Vol. 55, no. 3. P. 225–233. doi: 10.1016/j.biopsych.2003.09.017

Marczynski T., Yamaguchi P. N. Sleep induced by the administration of melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine) to the hypothalamus of unrestrained cats // Experientia. 1964. Vol. 20, no. 8. P. 435–437.

Martina P., Horst-Werner K., Helmut W. The role of the melatoninergic system in light-entrained behavior of mice // Int. J. Mol. Sci. 2017. Vol. 18, no. 3. P. 1–8. doi: 3390/ijms18030530

Mirmiran M., Pevet P. Effects of melatonin and 5-methoxytryptamine on sleep-wake patterns in the male rat // J. Pineal Res. 1986. Vol. 3, no. 2. P. 135–141.

Pacchierotti C., Iapichino S., Bossini L., Pieraccini F., Castrogiovanni P. Melatonin in psychiatric disorders: A review on the melatonin involvement in psychiatry // Frontiers in Neuroendocrinology. 2001. Vol. 22, no. 1. P. 18–32. doi: 10.1006/frne.2000.0202

Prendergast B. J., Zucker I. Ultradian rhythms in mammalian physiology and behavior // Curr. Opin. Neurobiol. 2016. Vol. 40. P. 150–154. doi: 10.1016/j.conb.2016.07.011

Redman J. R., Armstrong S. M., Ng K. T. Free-running activity rhythms in the rat: Entrainment by melatonin // Science. 1983. Vol. 219, no. 4588. P. 1089–1091.

Reiter R. J., Tan D.-X., Korkmaz A., Rosales-Corral S. A. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology // Hum. Reprod. Updat. 2014. Vol. 20, no. 2. P. 293–307. doi: 10.1093/humupd/dmt054

Roman E., Karlsson O. Increased anxiety-like behavior but no cognitive impairments in adult rats exposed to constant light conditions during perinatal development // Ups. J. Med. Sci. 2013. Vol. 118, no. 4. P. 222–227. doi: 10.3109/03009734.2013.821191

Romijn H. The pineal, a tranquilizing organ? // Life Sci. 1978. Vol. 23, no. 23. P. 2257–2273. doi: 10.1016/0024-3205(78)90191-1

Russart K. L. G., Nelson R. J. Artificial light at night alters behavior in laboratory and wild animals // J. Exp. Zool. A: Ecol. Integr. Physiol. 2018. P. 1–8. doi: 10.1002/jez.2173

Sandyk R., Kay S. R. Pineal melatonin in schizophrenia: A review and hypothesis // Schizophr. Bull. 1990. Vol. 16, no. 4. P. 653–662.

Savaskan E., Ayoub M. A., Ravid R., Angeloni D., Fraschini F., Meier F., Eckert A., Müller-Spahn F., Jockers R. Reduced hippocampal MT2 expression in Alzheimer's disease // J. Pineal Res. 2005. Vol. 38, no. 1. P. 10–16. doi: 10.1111/j.1600-079X.2004.00169.x

Savaskan E., Olivieri G., Meier F., Brydon L., Jockers R., Ravid R., Wirz-Justice A., Müller-Spahn F. Increased melatonin 1a-receptor immunoreactivity in the hippocampus of Alzheimer's disease patients // J. Pineal Res. 2002. Vol. 32, no. 1. P. 59–62. doi: 10.1034/j.1600-079x.2002.00841.x

Smarr B. L., Grant Azure D., Luz P., Irving Z., Lance J. K. Maternal and early-life circadian disruption have long-lasting negative consequences on offspring development and adult behavior in mice // Scientific Reports. 2017. Vol. 7, no. 1. P. 1–12. doi: 10.1038/s41598-017-03406-4

Spichiger C., Torres-Farfan C., Galdames H. A., Mendez N., Alonso-Vazquez P., Richter H. G. Gestation under chronic constant light leads to extensive gene expression changes in the fetal rat liver // Physiol. Genomics. 2015. Vol. 47, no. 12. P. 621–633. doi: 10.1152/physiolgenomics.00023.2015

Srinivasan V., Smits M., Spence W., Lowe A. D., Kayumov L., Pandi-Perumal S. R., Parry B., Cardinali D. P. Melatonin in mood disorders // World J. Biol. Psychiatry. 2006. Vol. 7, no. 3. P. 138–151. doi: 10.1080/15622970600571822

Sugden D. Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1983. Vol. 227, no. 3. P. 587–591.

Tapia-Osorio A., Salgado-Delgado R., Angeles-Castellanos M., Escobara C. Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat // Behav. Brain Res. 2013. Vol. 252. P. 1–9. doi: 10.1016/j.bbr.2013.05.028

Torres-Farfan C., Richter H. G., Germain A. M., Valenzuela G. J., Campino C., Rojas-García P., Forcelledo M. L., Torrealba F., Serón-Ferré M. Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland // J. Physiol. 2004. Vol. 554, no. 3. P. 841–856. doi: 10.1113/jphysiol.2003.056465

Varcoe T. J., Boden M. J., Voultzios A., Salkeld M. D., Rattanatray L., Kennaway D. J. Characterisation of the maternal response to chronic phase shifts during gestation in the rat: implications for fetal metabolic programming // PLoS ONE. 2013. Vol. 8, no. 1. P. e53800. doi: 10.1371/journal.pone.0053800

Varcoe T. J., Wight N., Voultzios A., Salkeld M. D., Kennaway D. J. Chronic phase shifts of the photoperiod throughout pregnancy programs glucose intolerance and insulin resistance in the rat // PLoS ONE. 2011. Vol. 6, no. 4. P. e18504. doi: 10.1371/journal.pone.0018504

Vilches N., Spichiger C., Mendez N., Abarzua-Catalan L., Galdames H. A., Hazlerigg D. G., Richter H. G., Torres-Farfan C. Gestational chronodisruption impairs hippocampal expression of NMDA receptor subunits Grin1b/Grin3a and spatial memory in the adult offspring // PLoS ONE. 2014. Vol. 9, no. 3. P. e91313. doi: 10.1371/journal.pone.0091313

Weaver I. C., Cervoni N., Champagne F. A., D'Alessio A. C., Sharma S., Seckl J. R., Dymov S., Szyf M., Meaney M. J. Epigenetic programming by maternal behavior // *Nat. Neurosci.* 2004. Vol. 7, no. 8. P. 847–854. doi: 10.1038/nn1276

Wurtman R. J., Lieberman H. S. Melatonin secretion as a mediator of circadian variations in sleep and sleepiness // *J. Pineal Res.* 1985. Vol. 2, no. 3. P. 301–303.

Поступила в редакцию 15.10.2018

References

Anisimov V. N., Khavinson V. Kh., Zavarzina N. Yu., Zabezhinskii M. A., Zimina O. A., Popovich I. G., Shtylik A. V., Arutyunyan A. V., Oparina T. I., Prokopenko V. M. Vliyanie peptida epifiza na pokazateli biologicheskogo vozrasta i prodolzhitel'nost' zhizni myshei [Effect of pineal peptide on parameters of the biological age and life span in mice]. *Ros. fiziol. zhurn. im. I. M. Sechenova* [Neuroscience and Behavioral Physiology]. 2001. Vol. 87, no. 1. P. 125–135.

Vinogradova I. A. Svrnitel'noe izuchenie vliyaniya razlichnykh rezhimov na psikhoemotsional'nye proyavleniya i dvigatel'nuyu aktivnost' u krysa [Comparative study of the influence of different light regimes on psychoemotional manifestations and movement activity of rats]. *Vestnik NGU. Ser. Biologiya, klinicheskaya meditsina* [Bull. NSU. Series: Biology, Clinical Medicine]. 2006. Vol. 4, iss. 2. P. 69–77.

Seraya krysa: Sistematika, ekologiya, regulyatsiya chislennosti [Brown rat: Systematics, ecology, regulation of numbers]. Moscow: Nauka, 1990. 456 p.

Eticheskaya ekspertiza biomeditsinskikh issledovaniy. Prakticheskie rekomendatsii [Ethical examination of biomedical research. Practical guidelines]. Moscow, 2005. 156 p.

Bolton J. L., Bilbo S. D. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2014. Vol. 16. P. 307–320.

Bronson S. L., Bale T. L. The placenta as a mediator of stress effects on neurodevelopmental reprogramming. *Neuropsychopharmacol.* 2016. Vol. 41, no. 1. P. 207–218. doi: 10.1038/npp.2015.231

Cassone V. M., Chesworth M. J., Armstrong S. M. Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin. *J. Biol. Rhythms.* 1986a. Vol. 1, no. 3. P. 219–229. doi: 10.1177/074873048600100304

Cassone V. M., Chesworth M. J., Armstrong S. M. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic supra chiasmatic nuclei. *Physiol. Behav.* 1986b. Vol. 36, no. 6. P. 1111–1121. doi: 10.1016/0031-9384(86)90488-9

Cassone V. M. The pineal gland influences rat circadian activity rhythms in constant light. *J. Biol. Rhythms.* 1992. Vol. 7, no. 1. P. 27–40. doi: 10.1177/074873049200700103

Connors S. L., Levitt P., Matthews S. G., Slotkin T. A., Johnston M. V., Kinney H. C., Johnson W. G., Dailey R. M., Zimmerman A. W. Fetal mechanisms in neurodevelopmental disorders. *Pediatr. Neurol.* 2008. Vol. 38, no. 3. P. 163–176. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2007.10.009

Froy O. Circadian rhythms, aging, and life span in mammals. *Physiology.* 2011. Vol. 26, no. 4. P. 225–235. doi: 10.1152/physiol.00012.2011

Golombek D. A., Escobar E., Cardinali D. P. Melatonin-induced depression of locomotor activity in hamsters: time dependency and inhibition by the central type benzodiazepine antagonist Ro 15–1788. *Physiol. Behav.* 1991. Vol. 49, no. 6. P. 1091–1098. doi: 10.1016/0031-9384(91)90336-M

Holmes S. W., Sugden D. Effects of melatonin on sleep and neurochemistry in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1982. Vol. 76, no. 1. P. 95–101. doi: 10.1111/j.1476-5381.1982.tb09194.x

Karatsoreos I. N., Bhagat S., Bloss E. B., Morrison J. H., McEwen B. S. Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. Vol. 108, no. 4. P. 1657–1662. doi: 10.1073/pnas.1018375108

Karatsoreos I. N. Effects of circadian disruption on mental and physical health. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2012. Vol. 12, no. 2. P. 218–225. doi: 10.1007/s11910-012-0252-0

Leith S. J., Carpenter D. O. Special vulnerability of children to environmental exposures. *Rev. Environ. Health.* 2012. Vol. 27, no. 4. P. 151–157. doi: 10.1515/revh-2012-0024

López-Figueroa A. L., Norton C. S., López-Figueroa M. O., Armellini-Dodel D., Burke S., Akil H., López J. F., Watson S. J. Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *J. Biol. Psychiatry.* 2004. Vol. 55, no. 3. P. 225–233. doi: 10.1016/j.biopsych.2003.09.017

Marczynski T., Yamaguchi P. N. Sleep induced by the administration of melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine) to the hypothalamus of unrestrained cats. *Experientia.* 1964. Vol. 20, no. 8. P. 435–437.

Martina P., Horst-Werner K., Helmut W. The role of the melatoninergic system in light-entrained behavior of mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18, no. 3. P. 1–8. doi: 3390/ijms18030530

Mirmiran M., Pevet P. Effects of melatonin and 5-methoxytryptamine on sleep-wake patterns in the male rat. *J. Pineal Res.* 1986. Vol. 3, no. 2. P. 135–141.

Pacchierotti C., Iapichino S., Bossini L., Pieracini F., Castrogiovanni P. Melatonin in psychiatric disorders: A review on the melatonin involvement in psychiatry. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2001. Vol. 22, no. 1. P. 18–32. doi: 10.1006/frne.2000.0202

Prendergast B. J., Zucker I. Ultradian rhythms in mammalian physiology and behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2016. Vol. 40. P. 150–154. doi: 10.1016/j.conb.2016.07.011

Redman J. R., Armstrong S. M., Ng K. T. Free-running activity rhythms in the rat: Entrainment by melatonin. *Science.* 1983. Vol. 219, no. 4588. P. 1089–1091.

Reiter R. J., Tan D.-X., Korkmaz A., Rosales-Corral S. A. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum. Reprod. Updat.* 2014. Vol. 20, no. 2. P. 293–307. doi: 10.1093/humupd/dmt054

Roman E., Karlsson O. Increased anxiety-like behavior but no cognitive impairments in adult rats exposed to constant light conditions during perinatal development. *Ups. J. Med. Sci.* 2013. Vol. 118, no. 4. P. 222–227. doi: 10.3109/03009734.2013.821191

Romijn H. The pineal, a tranquilizing organ? *Life Sci.* 1978. Vol. 23, no. 23. P. 2257–2273. doi: 10.1016/0024-3205(78)90191-1

Russart K. L. G., Nelson R. J. Artificial light at night alters behavior in laboratory and wild animals. *J. Exp. Zool. A: Ecol. Integr. Physiol.* 2018. P. 1–8. doi: 10.1002/jez.2173

Sandyk R., Kay S. R. Pineal melatonin in schizophrenia: A review and hypothesis. *Schizophr. Bull.* 1990. Vol. 16, no. 4. P. 653–662.

Savaskan E., Ayoub M. A., Ravid R., Angeloni D., Fraschini F., Meier F., Eckert A., Müller-Spahn F., Jockers R. Reduced hippocampal MT2 expression in Alzheimer's disease. *J. Pineal Res.* 2005. Vol. 38, no. 1. P. 10–16. doi: 10.1111/j.1600-079X.2004.00169.x

Savaskan E., Olivieri G., Meier F., Brydon L., Jockers R., Ravid R., Wirz-Justice A., Müller-Spahn F. Increased melatonin 1a-receptor immunoreactivity in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *J. Pineal Res.* 2002. Vol. 32, no. 1. P. 59–62. doi: 10.1034/j.1600-079x.2002.00841.x

Smarr B. L., Grant Azure D., Luz P., Irving Z., Lance J. K. Maternal and early-life circadian disruption have long-lasting negative consequences on offspring development and adult behavior in mice. *Scientific Reports.* 2017. Vol. 7, no. 1. P. 1–12. doi: 10.1038/s41598-017-03406-4

Spichiger C., Torres-Farfan C., Galdames H. A., Mendez N., Alonso-Vazquez P., Richter H. G. Gestation under chronic constant light leads to extensive gene expression changes in the fetal rat liver. *Physiol. Genomics.* 2015. Vol. 47, no. 12. P. 621–633. doi: 10.1152/physiolgenomics.00023.2015

Srinivasan V., Smits M., Spence W., Lowe A. D., Kayumov L., Pandi-Perumal S. R., Parry B., Car-

dinali D. P. Melatonin in mood disorders. *World J. Biol. Psychiatry.* 2006. Vol. 7, no. 3. P. 138–151. doi: 10.1080/15622970600571822

Sugden D. Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1983. Vol. 227, no. 3. P. 587–591.

Tapia-Orsorio A., Salgado-Delgado R., Angeles-Castellanos M., Escobara C. Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behav. Brain Res.* 2013. Vol. 252. P. 1–9. doi: 10.1016/j.bbr.2013.05.028

Torres-Farfan C., Richter H. G., Germain A. M., Valenzuela G. J., Campino C., Rojas-García P., Forcellido M. L., Torrealba F., Serón-Ferré M. Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. *J. Physiol.* 2004. Vol. 554, no. 3. P. 841–856. doi: 10.1113/jphysiol.2003.056465

Varcoe T. J., Boden M. J., Voultzios A., Salkeld M. D., Rattanaray L., Kennaway D. J. Characterisation of the maternal response to chronic phase shifts during gestation in the rat: implications for fetal metabolic programming. *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8, no. 1. P. e53800. doi: 10.1371/journal.pone.0053800

Varcoe T. J., Wight N., Voultzios A., Salkeld M. D., Kennaway D. J. Chronic phase shifts of the photoperiod throughout pregnancy programs glucose intolerance and insulin resistance in the rat. *PLoS ONE.* 2011. Vol. 6, no. 4. P. e18504. doi: 10.1371/journal.pone.0018504

Vilches N., Spichiger C., Mendez N., Abarzua-Catalan L., Galdames H. A., Hazlerigg D. G., Richter H. G., Torres-Farfan C. Gestational chronodisruption impairs hippocampal expression of NMDA receptor subunits Grin1b/Grin3a and spatial memory in the adult offspring. *PLoS ONE.* 2014. Vol. 9, no. 3. P. e91313. doi: 10.1371/journal.pone.0091313

Weaver I. C., Cervoni N., Champagne F. A., D'Alessio A. C., Sharma S., Seckl J. R., Dymov S., Szyf M., Meaney M. J. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* 2004. Vol. 7, no. 8. P. 847–854. doi: 10.1038/nn1276

Wurtman R. J., Lieberman H. S. Melatonin secretion as a mediator of circadian variations in sleep and sleepiness. *J. Pineal Res.* 1985. Vol. 2, no. 3. P. 301–303.

Received October 15, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Хижкин Евгений Александрович

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН, Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр РАН» ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910

преподаватель
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: hizhkin84@mail.ru
тел.: (8142) 573107

CONTRIBUTORS:

Khizhkin, Evgeny

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

Petrozavodsk State University
33 Lenin Pr., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: hizhkin84@mail.ru
tel.: (8142) 573107

Гулявина Алина Вячеславовна

магистрант
Петрозаводский государственный университет, Институт
биологии, экологии и агротехнологии
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: alina_1994.09@mail.ru

Илюха Виктор Александрович

директор, д. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН, Федеральный
исследовательский центр «Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ilyukha@bio.krc.karelia.ru

Виноградова Ирина Анатольевна

заведующая кафедрой фармакологии, организации
и экономики фармации, д. м. н.
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: irinav@petrsu.ru

Морозов Артем Владимирович

ведущий биолог
Институт биологии КарНЦ РАН, Федеральный
исследовательский центр «Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: artem.morozow@yandex.ru

Брулер Екатерина Сергеевна

магистрант
Петрозаводский государственный университет, Институт
биологии, экологии и агротехнологии
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
e-mail: bruler.ekaterina@mail.ru

Gulyavina, Alina

Petrozavodsk State University
33 Lenin Pr., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: alina_1994.09@mail.ru

Ilyukha, Viktor

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

Vinogradova, Irina

Petrozavodsk State University
33 Lenin Pr., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: iri89569627@yandex.ru

Morozov, Artyom

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

Bruler, Ekaterina

Petrozavodsk State University
33 Lenin Pr., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: bruler.ekaterina@mail.ru
katerina@mail.ru

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 591.11:639.113.5:639.113.5

ЛЕЙКОЦИТЫ КРОВИ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗАХ ВИТАМИНОВ А И Е У АМЕРИКАНСКИХ НОРОК (*NEOVISON VISON*)

**И. В. Баишникова, Л. Б. Узенбаева, В. А. Илюха,
А. Г. Кижина, Э. Ф. Печорина, Т. Н. Ильина**

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

Исследовали влияние дополнительного введения в рацион различных доз витаминов А и Е на количество лейкоцитов, состав лейкоцитарной формулы, а также морфометрические параметры лимфоцитов периферической крови у разводимых в условиях зоокультуры темно-коричневых американских норок (*Neovison vison*, Mustelidae, Carnivora). Установлено, что для норок характерно относительно высокое количество лейкоцитов с преобладанием в лейкоформуле нейтрофилов и более низким содержанием лимфоцитов. С помощью компьютерной морфометрии определены параметры лимфоцитов (площадь поверхности ядра и клетки) у животных контрольной группы и при введении витаминов. Показано, что у исследуемых животных лимфоциты варьируют по величине площади поверхности как клетки, так и ядра. Добавки к рациону витаминов А и Е в течение 14 дней существенно не повлияли на количество лейкоцитов и состав лейкоцитарной формулы, изменения касались в основном морфометрических параметров лимфоцитов. Оба витамина вызвали увеличение площади поверхности клеток, размеров цитоплазмы, а витамин Е в дозе 4 мг/животное – также и площади поверхности ядер. Повышение среднего размера лимфоцитов происходило вследствие уменьшения доли самых мелких клеток и увеличения количества средних и больших. Изменение распределения лимфоцитов по размеру особенно четко проявилось у животных, получавших витамин Е. Сделан вывод о том, что у норок иммуномодулирующее действие витаминов А и Е привело к изменению параметров лимфоцитов, а возможно, и их морфофункционального состояния.

Ключевые слова: норки; лейкоциты; компьютерная морфометрия; витамин А; витамин Е.

**I. V. Baishnikova, L. B. Uzenbaeva, V. A. Ilyukha, A. G. Kizhina,
E. F. Pechorina, T. N. Ilyina. BLOOD LEUKOCYTES AND MORPHOMETRIC
PARAMETERS OF LYMPHOCYTES AT DIFFERENT DOSES OF VITAMINS
A AND E IN AMERICAN MINKS (*NEOVISON VISON*)**

The effect of dietary supplementation of vitamins A and E on total and differential leukocyte count as well as morphometric parameters of lymphocytes in peripheral blood

of farmed dark-brown American mink (*Neovison vison*, Mustelidae, Carnivora) was examined. The mink were characterized by a relatively high number of leukocytes in blood with predominance of neutrophils and a lower content of lymphocytes. The parameters of lymphocytes (surface area and nuclei area) in control and experimental animals were determined by computer morphometry. Lymphocytes in mink peripheral blood were shown to vary in both cell surface area and in nuclei surface area. Supplementation with vitamins A and E for 14 days had no significant effect on the number of leukocytes and differential leukocyte count, but changed the morphometric parameters of lymphocytes. Both vitamins caused an increase in the surface area of the cells, cytoplasm dimensions, and vitamin E in a dose of 4 mg / animal promoted the nuclei surface area. The increase in the average size of lymphocytes occurred due to a decrease in the proportion of the smallest cells and an increase in the number of medium and large cells. This dependency was the most explicit in the groups receiving vitamin E. It was concluded that in mink the immunomodulatory effects of vitamins A and E led to a change in the parameters of lymphocytes, and, possibly, their morphofunctional state.

Key words: minks; leucocytes; computer morphometry; vitamin A; vitamin E.

Введение

Американская норка (*Neovison vison*, Mustelidae, Carnivora), получившая широкое распространение как объект зоокультуры, представляет уникальную экспериментальную модель с точки зрения ряда присущих ей физиолого-биохимических и иммунологических особенностей. Для вида характерно большое количество мутантных форм, отличающихся от дикого типа по окраске меха и многим другим параметрам, в частности иммунореактивности [Трапезов, 2008]. На сегодняшний день среди множества окрасов наибольшее распространение получила близкая к дикому типу стандартная темно-коричневая норка. Интересно, что у норок при клеточном содержании, а не у их диких предков, возникла алеутская болезнь (вирусный плазмозитоз) – медленно развивающееся инфекционное заболевание, характеризующееся распространенной плазмочелочной пролиферацией, увеличением CD8-положительных лимфоцитов при неизменном количестве В-клеток [Aasted, 1989].

Среди биологически активных соединений, оказывающих влияние на иммунную систему, важная роль отводится витаминам. Во многих исследованиях установлено, что выраженными иммуномодулирующими свойствами обладают витамины А и Е [Adolfsson et al., 2001; Han et al., 2004; Chen et al., 2008; Ertesvåg et al., 2009]. В связи с этим большое значение имеет изучение влияния данных нутриентов на морфофункциональное состояние иммунокомпетентных клеток. Причем наибольший интерес представляет анализ морфофункциональных особенностей лимфоцитов, которые являются структурной и функциональной единицей специфического иммунитета.

В настоящее время имеются доказательства, что в качестве метода мониторинга иммунного статуса может быть использована компьютерная морфометрия. Морфометрические показатели относятся к объективным критериям, позволяющим получить не только размерные показатели клеток, но и данные об их морфофункциональной организации [Виноградская, 2005]. Информативность и клиническая значимость данных компьютерной морфометрии лимфоцитов выявлена у человека при диагностике некоторых видов патологии [Детиненко, 2006; Ватазин и др., 2009]. В предыдущих исследованиях нами определены параметры лимфоцитов периферической крови и обнаружены видовые особенности влияния витаминов А и Е на распределение этих клеток по размерам у лисиц (*Vulpes vulpes*) и песцов (*Vulpes син. Alopex lagopus*) – видов из семейства Canidae отряда Carnivora.

Целью данной работы являлось исследование количества лейкоцитов, состава лейкоцитарной формулы и морфометрических параметров лимфоцитов (площадь поверхности клетки и ядра) при введении в рацион темно-коричневых американских норок разных доз витаминов А и Е.

Материалы и методы

Исследования выполнены с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук». Проведено изучение влияния витаминов А и Е на гематологические параметры у введенных в зоокультуру 6–7-месячных темно-коричневых норок (ноябрь), продолжительность опыта составила 14 дней. Жи-

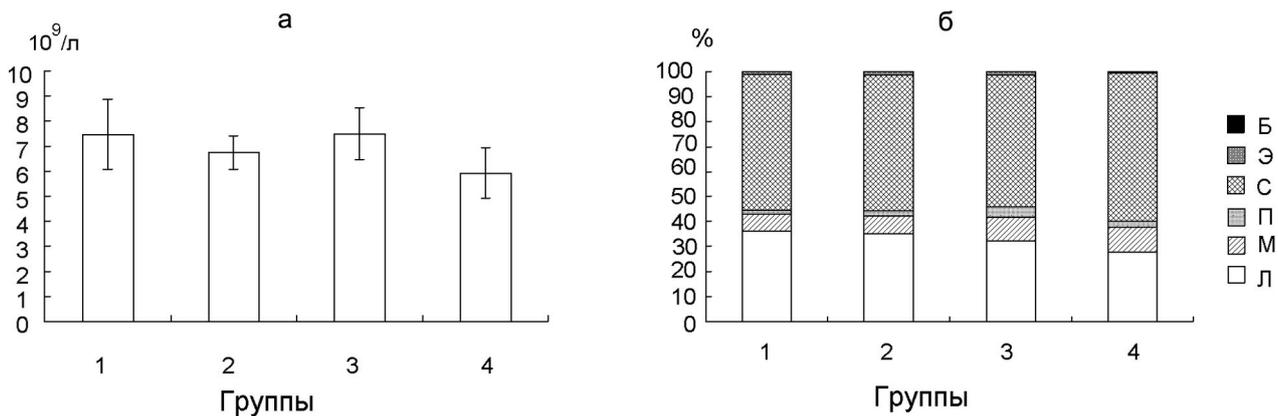


Рис. 1. Количество лейкоцитов (а) и состав лейкоформулы (б) в периферической крови темно-коричневых норок:

Б – базофилы; Э – эозинофилы; С – сегментоядерные нейтрофилы; П – палочкоядерные нейтрофилы; М – моноциты; Л – лимфоциты.

Здесь и на рис. 3: 1 – контрольная группа; 2 – витамин А в дозе 500 МЕ; 3 – витамин Е в дозе 4 мг; 4 – витамин Е в дозе 20 мг

Fig. 1. Total leukocyte count (а) and differential leukocyte count (б) in peripheral blood of dark-brown minks:

Б – basophils; Э – eosinophils; С – segmented neutrophils; П – band neutrophils; М – monocytes; Л – lymphocytes.

Here and in Fig. 3: 1 – control group; 2 – vitamin A in dose 500 IE; 3 – vitamin E in dose 4 mg; 4 – vitamin E in dose 20 mg

вотные содержались парами (самки и самцы) и получали основной рацион (ОР) зверохозяйства. Норкам экспериментальных групп дополнительно добавляли разные дозы витаминов А (Lutavit A 1000 Plus, Германия) или Е (Сухавит Е 50, Германия) из расчета на голову в сутки. Норки примерно одинакового веса были разделены на четыре группы: 1 – контрольная (ОР, n = 6), 2 – ОР + 500 МЕ витамина А (n = 9), 3 – ОР + 4 мг витамина Е (n = 10), 4 – ОР + 20 мг витамина Е (n = 10). ОР содержал 200 МЕ витамина А и 2 мг витамина Е на голову в сутки, что является нормой для зверей осенью.

Кровь для анализа получали на следующий день после окончания эксперимента утром натощак из кончика хвоста. Количество лейкоцитов оценивали общепринятым методом, состав лейкоформулы и морфометрические параметры лимфоцитов определяли на мазках периферической крови, окрашенных по Паппенгейму. В работе использовали световой микроскоп Axioscop 40 (Carl Zeiss) с цветной цифровой видеокамерой (Pixera 150ES) и компьютерной системой анализа изображений «Видеотест». При просмотре мазков крови для подсчета лейкоцитарной формулы визуально определяли типы лейкоцитов, создавали базу их изображений и после сортировки осуществляли передачу данных в MS Excel. Площадь ядер и поверхности лимфоцитов измеряли с помощью методики NCR (nuclear-cytoplasmic ratio), которая позволяет определить параметры клеток и внутриклеточных структур. Производили микроскопическую съемку лимфоцитов, в автоматическом режиме выделяли их изображения, которые попали в кадр, и передавали измерения

площади поверхности в MS Excel. Размеры лимфоцитов (ядра и клетки) определены у 1031 лимфоцита норок.

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

Результаты и обсуждение

Лейкоцитам принадлежит важная роль в поддержании гомеостаза, устойчивости и иммунореактивности организма. У норок контрольной группы в периферической крови наблюдалось относительно высокое количество лейкоцитов – в среднем $7,47 \times 10^9/\text{л}$ (рис. 1, а). В лейкоцитарной формуле преобладали сегментоядерные нейтрофилы, на долю которых приходилось $54,50 \pm 3,65\%$, а лимфоцитов немного меньше – $36,17 \pm 3,70\%$ (рис. 1, б). На светомикроскопическом уровне у норок форменные элементы крови за исключением эозинофилов имеют морфологию, свойственную другим видам отряда Carnivora.

Из гематологических параметров особого внимания заслуживает изучение морфофункциональной организации лимфоцитов, играющих важнейшую роль в контроле иммунного гомеостаза и аккумуляции информации о ре-

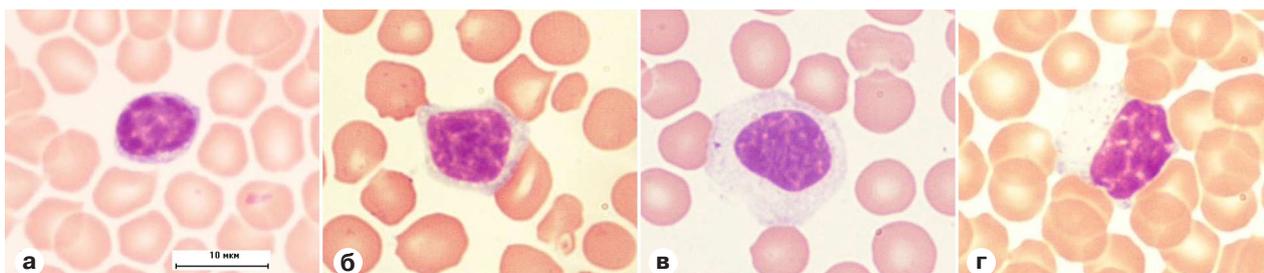


Рис. 2. Лимфоциты в периферической крови темно-коричневых норок:

а – малый; б – средний; в – большой; г – большой гранулярный; окраска по Паппенгейму; масштаб линейки 10 мкм

Fig. 2. Lymphocytes in peripheral blood of dark-brown minks:

а – small; б – medium-sized; в – large; г – large granular; Pappenheim stain; bar 10 mkm

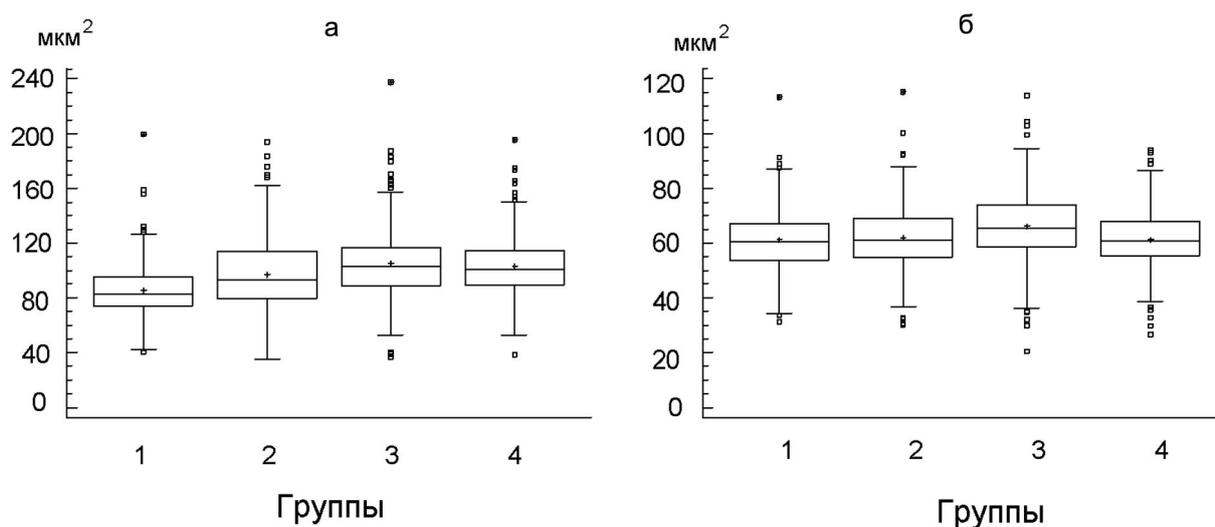


Рис. 3. Площадь лимфоцитов (а) и их ядер (б) у темно-коричневых норок:

(+) – среднее, (–) – медиана, □ – 25–75 %, ± – статистический диапазон, ◻ – выпадающие варианты

Fig. 3. Surface area (а) and nuclei area (б) of lymphocytes in dark-brown minks:

(+) – mean, (–) – median, □ – 25–75 %, ± – min – max, ◻ – outliers

ализации адаптивных и дизадаптивных процессов в организме [Ватазин и др., 2009]. Известно, что популяция лимфоцитов состоит из клеточных форм, отличающихся по размерам, морфологии, микроструктуре и функциям. Так, в исследованиях у человека выявлено, что незрелые тимоциты являются крупными бластами и клетками среднего размера, а Т-клетки памяти по размеру больше наивных, но мельче активированных [Давыдкин и др., 2010].

Исходя из проведенных нами микроскопических наблюдений видно, что в крови норок встречаются в основном малые, средние и редко большие лимфоциты, или, по другой терминологии, узко-, средне- и широкоцитоплазменные (рис. 2, а–в). Большие гранулярные лимфоциты, относящиеся к естественным киллерам, наблюдаются крайне редко (рис. 2, г). Ядра в лимфоцитах округлой или овальной формы, иногда с выемкой. Структура хрома-

тина в мелких лимфоцитах более грубая, чем в больших. Морфометрический анализ подтвердил вариабельность морфометрических параметров лимфоцитов. У норок контрольной группы в популяции преобладали лимфоциты с площадью поверхности около 100 мкм², некоторые достигали большей величины, вплоть до 200 мкм². В среднем площадь поверхности лимфоцитов составляла $85,80 \pm 1,58$ мкм², а их ядер – $61,26 \pm 0,91$ мкм² (рис. 3).

Дополнительное введение в рацион в течение 14 дней витаминов А и Е существенно не повлияло на общее содержание лейкоцитов и состав лейкоформулы норок (рис. 1). Также не было обнаружено каких-либо изменений в морфологии лимфоцитов. На светомикроскопическом уровне во всех исследованных группах циркулирующие лимфоциты были представлены относительно гладкими формами. В отличие от норок у песцов – представителей семейства

Canidae – при действии витамина А в периферической крови встречались лимфоциты с бульбарными цитоплазматическими выростами [Узенбаева и др., 2013]. Подобные изменения поверхностной архитектоники лимфоцитов обнаружены у человека при кратковременной высокогорной адаптации [Нартаева, 2013].

Отсутствие влияния на общее количество лейкоцитов и состав лейкоформулы, возможно, объясняется действием витаминов преимущественно на продукцию и функции отдельных типов этих клеток. В обзорных работах показано, что витамин А является регулятором развития, влияющим на детерминацию, пролиферацию и дифференцировку, т. е. на гистогенез клеток и тканей мезенхимной природы [Афанасьев и др., 1990; Webb, Villamor, 2007; Chen et al., 2008].

Дополнительное введение в рацион норок витаминов А и Е привело к изменениям морфометрических параметров лимфоцитов и их распределения по размеру (рис. 3). При добавке витамина А в дозе 500 МЕ по сравнению с контролем достоверно увеличивалась площадь поверхности клеток, а также диапазон ее колебаний при неизменной величине ядер. Сохранение площади поверхности ядер на уровне таковой у контрольных животных свидетельствует о повышении количества широкоцитоплазменных лимфоцитов.

Сходные изменения наблюдались при действии витамина Е, в результате чего в популяции возросла доля лимфоцитов большего размера за счет уменьшения количества самых мелких клеток. Однако в отличие от витамина А при меньшей дозе (4 мг на животное) увеличилась площадь поверхности не только лимфоцитов, но также и их ядер. Под влиянием более высокой дозы витамина Е (20 мг на животное), как и в случае с витамином А, происходило возрастание площади поверхности клеток при отсутствии изменений со стороны их ядер. В литературе встречаются данные о том, что эффект витамина Е зависит от применяемой дозы. Так, в культуре спленоцитов было показано, что низкая доза а-токоферола повышала экспрессию генов интерлейкина-2, который играет ключевую роль в активации и пролиферации Т-лимфоцитов, тогда как при высокой дозе обнаружено противоположное действие [Hsieh et al., 2006]. У крыс и кошек высокие дозы витамина Е не имели преимуществ по сравнению с умеренными в стимуляции пролиферации лимфоцитов, а в некоторых случаях даже снижали ее [Bendich et al., 1986; O'Brien et al., 2015].

Изменение морфометрических параметров лимфоцитов может объясняться перестройкой в иммунной системе, сопровождающейся появ-

лением групп клеток с иными размерными параметрами, характеризующими внутриклеточный метаболизм и содержание белкового вещества в клетке [Ватазин и др., 2009]. С помощью витальной компьютерной морфометрии установлено, что увеличение диаметра, периметра и площади соответствует уровню активации иммунокомпетентных клеток, а фазовая высота и объем – состоянию ядерных структур, причем уменьшение высоты и объема совпадает с высоким пролиферативным потенциалом клетки [Давыдкин и др., 2010]. Кроме того, процесс активации лимфоцитов сопровождается изменением метаболизма мембранных фосфолипидов: как синтезом *de novo*, так и обновлением, т. е. затрагивает структурно-функциональные особенности клеточной мембраны [Calder et al., 1994]. Морфометрические признаки активации лимфоцитов были продемонстрированы при сочетании хронической трансплантационной нефропатии и острого отторжения трансплантата. При этом на фоне ареактивности Т-звена иммунитета в популяции В-клеток вследствие активации увеличивались диаметр, периметр и площадь [Детиненко, 2006].

Согласно данным литературы, лимфоциты быстро реагируют на препараты с иммуномодулирующим влиянием [Труфакин и др., 2005]. Наблюдаемое нами изменение морфометрических параметров лимфоцитов периферической крови у темно-коричневых норок, получавших витамины, по-видимому, отражает структурно-функциональную перестройку лимфопоэза. Действие витамина А в основном опосредовано его активным метаболитом – ретиноевой кислотой, играющей значительную роль в осуществлении локальных иммунных реакций [Erkelens, Mebius, 2017]. Важным эффектом ретиноидов, обуславливающим влияние на иммунную систему, является способность поддерживать нормальное функционирование В- и Т-лимфоцитов [Ertesvåg et al., 2009]. Иммуномодулирующее действие витамина Е связано как с его антиоксидантными свойствами, обеспечивающими стабильность мембран иммунокомпетентных клеток, оптимальное функционирование мембранных рецепторов, активность ферментов и межклеточные взаимодействия [Adolfsson et al., 2001], так и с его влиянием на гены, связанные с регуляцией клеточного цикла [Han et al., 2004].

Заключение

Таким образом, дополнительное введение в рацион витаминов А и Е у разводимых в условиях зоокультуры американских норок существ-

венно не повлияло на количество лейкоцитов и лейкоформулу, но привело к изменению морфометрических параметров лимфоцитов. Витамин А в дозе 500 МЕ на одно животное вызывал достоверное увеличение площади поверхности клеток и отсутствие изменений со стороны ядра. Влияние витамина Е на параметры лимфоцитов зависело от дозы: при дозе 20 мг, так же как и при действии витамина А, увеличивалась только площадь поверхности клеток, тогда как меньшая доза (4 мг на животное) приводила к увеличению площади поверхности и их ядер. Можно предположить, что у норок иммуномодулирующее влияние витаминов А и Е проявляется в изменении параметров лимфоцитов и вследствие этого распределении их по размерам, а возможно, и в перестройке субпулционного состава в периферической крови.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0221-2017-0052).

Литература

- Афанасьев Ю. И., Ноздрин В. И., Волков Ю. Т., Никифорова С. А. Витамин А – регулирующий фактор процессов гистогенеза // Успехи соврем. биол. 1990. Т. 110, вып. 3, № 6. С. 410–418.
- Ватазин А. В., Василенко И. А., Валов А. Л., Метелин В. Б., Круглов Е. Е., Цалман А. Я. Витальная компьютерная морфометрия лимфоцитов в диагностике острого отторжения почечного аллотрансплантата // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2009. Т. 11, № 4. С. 18–25.
- Виноградская Ю. Б., Радзинский В. Е., Василенко И. А., Метелин В. Б. Витальная компьютерная фазометрия лимфоцитов периферической крови женщин в ранние сроки беременности // Вестник РУДН, сер. Медицина. Акушерство и гинекология. 2005. № 4(32). С. 78–83.
- Давыдкин И. Л., Федорова О. И., Захарова Н. О., Селезнев А. В. Компьютерная морфометрия лимфоцитов периферической крови у больных пневмонией различного возраста // Изв. Самарского НЦ РАН. 2010. Т. 12, № 1(7). С. 1734–1741.
- Детиненко И. Н. Сравнительная оценка информативности клеточной морфометрии и пункционной биопсии при хронической нефропатии трансплантата: Дис. ... канд. мед. наук. М., 2006. 103 с.
- Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных: Метод. пособие. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2007. 76 с.
- Нартаева А. К. Морфометрические показатели лимфоцитов здоровых людей, постоянно проживающих в условиях высокогорья // Вестник КРСУ. 2013. Т. 13, № 4. С. 143–145.
- Трапезов О. В. Регуляторные эффекты генов поведения и управления окрасочным формообразова-нием у американских норок (*Mustela vison* Schreber 1977) // Информационный вестник ВОГиС. 2008. Т. 12, № 1/2. С. 63–83.
- Труфакин В. А., Шурлыгина А. В., Робинсон М. В. Функциональная морфология клеток иммунной системы в эксперименте и клинике // Морфология. 2005. Т. 128, № 4. С. 20–24.
- Узенбаева Л. Б., Баишникова И. В., Кижина А. Г., Ильина Т. И., Илюха В. А., Тютюнник Н. Н. Морфологические особенности лимфоцитов периферической крови при введении витаминов А и Е в различных дозах // Морфология. 2013. Т. 143, № 3. С. 39–44.
- Aasted B. Mink Infected with Aleutian Disease Virus have an Elevated Level of CD8-Positive T-Lymphocytes // Vet. Immunol. Immunopathol. 1989. Vol. 20. P. 375–385. doi: 10.1016/0165-2427(89)90082-2
- Adolfsson O., Huber B. T., Meydani S. N. Vitamin E-enhanced IL-2 production in old mice: naïve but not memory T cells show increased cell division cycling and IL-2-producing capacity // J. Immunol. 2001. Vol. 167. P. 3809–3817. doi: 10.4049/jimmunol.167.7.3809
- Bendich A., Gabriel E., Machlin L. J. Dietary vitamin E requirement for optimum immune responses in the rat // J. Nutr. 1986. Vol. 116. P. 675–681. doi: 10.1093/jn/116.4.675
- Calder P. C., Yaqoob P., Harvey D. J., Watts A., Newsholme E. A. Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity // Biochem. J. 1994. Vol. 300. P. 509–518. doi: 10.1042/bj3000509
- Chen X., Esplin B. L., Garrett K. P., Welner R. S., Webb C. F., Kincade P. W. Retinoids accelerate B lineage lymphoid differentiation // J. Immunol. 2008. Vol. 180. P. 138–145. doi: 10.4049/jimmunol.180.1.138
- Erkelens M. N., Mebius R. E. Retinoic Acid and Immune Homeostasis: A Balancing Act // Trends Immunol. 2017. Vol. 38, no. 3. P. 168–180. doi: 10.1016/j.it.2016.12.006
- Ertesvåg Å., Naderi S., Blomhoff H. K. Regulation of B cell proliferation and differentiation by retinoic acid // Semin. Immunol. 2009. Vol. 21, no. 1. P. 36–41. doi: 10.1016/j.smim.2008.06.005
- Han S. N., Adolfsson O., Lee C.-K., Prolla T. A., Ordovas J., Meydani S. N. Vitamin E and Gene Expression in Immune Cells // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2004. Vol. 1031. P. 96–101. doi: 10.1196/annals.1331.010
- Hsieh C.-C., Huang C.-J., Lin Bi.-F. Low and high levels of a-tocopherol exert opposite effects on IL-2 possibly through the modulation of PPAR-g, Ikbα, and apoptotic pathway in activated splenocytes // Nutr. 2006. Vol. 22. P. 433–440. doi: 10.1016/j.nut.2005.10.001
- O'Brien T., Thomas D. G., Morel P. C. H., Rutherford-Markwick K. J. Moderate dietary supplementation with vitamin E enhances lymphocyte functionality in the adult cat // Res. Vet. Sci. 2015. Vol. 99. P. 63–69. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.01.007
- Webb A. L., Villamor E. Update: Effects of Antioxidant and Non-Antioxidant Vitamin Supplementation on Immune Function // Nutr. Rev. 2007. Vol. 65, no. 5. P. 181–217. doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00298.x

Поступила в редакцию 12.09.2018

References

Afanas'ev Yu. I., Nozdrin V. I., Volkov Yu. T., Nikiforova S. A. Vitamin A – reguliruyushchii faktor protsessov gistogeneza [Vitamin A – the regulatory factor of histogenesis processes]. *Uspekhi sovrem. biol.* [Biol. Bull. Reviews]. 1990. Vol. 31, no. 6. P. 410–418.

Davydkin I. L., Fedorova O. I., Zakharova N. O., Seleznev A. V. Komp'yuternaya morfometriya limfotsitov perifericheskoi krovi u bol'nykh pnevmoniei razlichnogo vozrasta [Computer morphometry of peripheral blood lymphocytes in patients of different age with pneumonia]. *Izv. Samarskogo NTs RAN* [Proceed. of the Samara Scientific Center, RAS]. 2010. Vol. 12, no. 1(7). P. 1734–1741.

Detinenko I. N. Sravnitel'naya otsenka informativnosti kletochnoi morfometrii i punktsionnoi biopsii pri khronicheskoi nefropatii transplantata [Comparative evaluation of informative value of cellular morphometry and puncture biopsy in chronic graft nephropathy]: DSc (Cand. of Med.) thesis. Moscow, 2006. 103 p.

Korosov A. V., Gorbach V. V. Komp'yuternaya obrabotka biologicheskikh dannyykh: Metod. posobie [Computer processing of biological data: a tutorial]. Petrozavodsk: Izd-vo PetrGU, 2007. 76 p.

Nartaeva A. K. Morfometricheskie pokazateli limfotsitov zdorovykh lyudei, postoyanno prozhivayushchikh v usloviyakh vysokogor'ya [Morphometric parameters of lymphocytes in healthy people constantly living at highlands]. *Vestnik KRSU*. 2013. Vol. 13, no. 4. P. 143–145.

Trapezov O. V. Regulyatornye efekty genov povedeniya i upravleniya okrasochnym formoobrazovaniem u amerikanskikh norok (*Mustela vison* Schreber, 1777) [The regulation role of genes of behavior in coat color formation in American mink (*Mustela vison* Schreber, 1777)]. *Informatsionnyi vestnik VOGiS* [VOGiS Herald]. 2008. Vol. 12, no. 1/2. P. 63–83.

Trufakin V. A., Shurygina A. V., Robinson M. V. Funktsional'naya morfologiya kletok immunnoi sistemy v eksperimente i klinike [Functional morphology of immune system cells experiments and clinical practice]. *Morfologiya* [Morphology]. 2005. Vol. 128, no. 4. P. 20–24.

Uzenbaeva L. B., Baishnikova I. V., Kizhina A. G., Il'ina T. N., Il'yukha V. A., Tyutyunnik N. N. Morfologicheskie osobennosti limfotsitov perifericheskoi krovi pestsov pri vedenii vitaminov A i E v razlichnykh dozakh [Morphological peculiarities of peripheral blood lymphocytes in arctic foxes after the administration of various doses of vitamins A and E]. *Morfologiya* [Morphology]. 2013. Vol. 143, no. 3. P. 39–44.

Vatazin A. V., Vasilenko I. A., Valov A. L., Metelin V. B., Kruglov E. E., Tsalman A. Ya. Vital'naya komp'yuternaya morfometriya limfotsitov v diagnostike ostrogo otorzheniya pochechnogo allotransplantata [Vital computer morphometry of lymphocytes in the diagnostics of acute renal allograft rejection]. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov* [Russ. J. of Trans-

plantology and Artificial Organs]. 2009. Vol. 11, no. 4. P. 18–25.

Vinogradskaya Yu. B., Radzinskii V. E., Vasilenko I. A., Metelin V. B. Vital'naya komp'yuternaya fazometriya limfotsitov perifericheskoi krovi zhenshchin v rannie sroki beremennosti [Vital computer phasometry of peripheral blood lymphocytes in early pregnancy]. *Vestnik RUDN, ser. Meditsina. Akusherstvo i ginekologiya* [RUDN J. of Medicine]. 2005. No. 4(32). P. 78–83.

Aasted B. Mink Infected with Aleutian Disease Virus have an Elevated Level of CD8-Positive T-Lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1989. Vol. 20. P. 375–385. doi: 10.1016/0165-2427(89)90082-2

Adolfsson O., Huber B. T., Meydani S. N. Vitamin E-enhanced IL-2 production in old mice: naive but not memory T cells show increased cell division cycling and IL-2-producing capacity. *J. Immunol.* 2001. Vol. 167. P. 3809–3817. doi: 10.4049/jimmunol.167.7.3809

Bendich A., Gabriel E., Machlin L. J. Dietary vitamin E requirement for optimum immune responses in the rat. *J. Nutr.* 1986. Vol. 116. P. 675–681. doi: 10.1093/jn/116.4.675

Calder P. C., Yaqoob P., Harvey D. J., Watts A., Newsholme E. A. Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochem. J.* 1994. Vol. 300. P. 509–518. doi: 10.1042/bj3000509

Chen X., Esplin B. L., Garrett K. P., Welner R. S., Webb C. F., Kincade P. W. Retinoids accelerate B lineage lymphoid differentiation. *J. Immunol.* 2008. Vol. 180. P. 138–145. doi: 10.4049/jimmunol.180.1.138

Erkelens M. N., Mebius R. E. Retinoic Acid and Immune Homeostasis: A Balancing Act. *Trends Immunol.* 2017. Vol. 38, no. 3. P. 168–180. doi: 10.1016/j.it.2016.12.006

Ertesvåg Å., Naderi S., Blomhoff H. K. Regulation of B cell proliferation and differentiation by retinoic acid. *Semin. Immunol.* 2009. Vol. 21, no. 1. P. 36–41. doi: 10.1016/j.smim.2008.06.005

Han S. N., Adolfsson O., Lee C.-K., Prolla T. A., Ordovas J., Meydani S. N. Vitamin E and Gene Expression in Immune Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004. Vol. 1031. P. 96–101. doi: 10.1196/annals.1331.010

Hsieh C.-C., Huang C.-J., Lin Bi.-F. Low and high levels of a-tocopherol exert opposite effects on IL-2 possibly through the modulation of PPAR-g, Ikb α , and apoptotic pathway in activated splenocytes. *Nutr.* 2006. Vol. 22. P. 433–440. doi: 10.1016/j.nut.2005.10.001

O'Brien T., Thomas D. G., Morel P. C. H., Rutherford-Markwick K. J. Moderate dietary supplementation with vitamin E enhances lymphocyte functionality in the adult cat. *Res. Vet. Sci.* 2015. Vol. 99. P. 63–69. doi: 10.1016/j.rvsc.2015

Webb A. L., Villamor E. Update: Effects of Antioxidant and Non-Antioxidant Vitamin Supplementation on Immune Function. *Nutr. Rev.* 2007. Vol. 65, no. 5. P. 181–217. doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00298.x

Received September 12, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Баишникова Ирина Валерьевна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: iravbai@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Узенбаева Людмила Борисовна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
тел.: (8142) 573107

Илюха Виктор Александрович

директор, д. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ilyukha@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

Кижина Александра Геннадьевна

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: golubewa81@yandex.ru
тел.: (8142) 573107

Печорина Эльвира Филипповна

главный биолог
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: elvi1955@yandex.ru
тел.: (8142) 573107

Ильина Татьяна Николаевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ilyina@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 573107

CONTRIBUTORS:

Baishnikova, Irina

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

Uzenbaeva, Lyudmila

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

Ilyukha, Victor

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

Kizhina, Alexandra

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

Pechorina, Elvira

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: elvi1955@yandex.ru
tel.: (8142) 573107

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
tel.: (8142) 573107

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ИЗБЫТКА ЦИНКА НА АПЕКС ПОБЕГА И ТЕМПЫ ОРГАНОГЕНЕЗА У РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ

Н. М. Казнина¹, Ю. В. Батова¹, А. Ф. Титов^{1,2}

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

² Отдел комплексных научных исследований КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

В условиях вегетационного опыта изучали влияние избытка цинка в корнеобитаемой среде (160 мг/кг субстрата) на состояние апекса побега и темпы органоогенеза у ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Нур во время прохождения растениями фазы выхода в трубку. Обнаружено, что у 30-дневных растений, находящихся в начале данной фазы развития, цинк в изученной концентрации тормозит рост апекса побега, отрицательно влияет на его дифференциацию и задерживает органоогенез. Предполагается, что подобный эффект связан с прямым воздействием металла на меристематическую активность клеток апекса, а также с его опосредованным действием, обусловленным изменениями в клеточном метаболизме. Спустя 45 сут, при завершении растениями фазы выхода в трубку, негативный эффект цинка на апекс побега нивелировался, что, по всей видимости, связано с активацией внутриклеточных механизмов детоксикации металла и, как следствие, восстановлением меристематической активности клеток. При этом за счет сокращения времени прохождения VI этапа органоогенеза опытные растения догоняли в своем развитии растения контрольного варианта и переходили к VII этапу органоогенеза практически одновременно с ними. Из полученных результатов также следует, что морфофизиологический метод наблюдения за состоянием апекса побега и темпами органоогенеза позволяет быстро и с высокой степенью надежности выявлять влияние тяжелых металлов на развитие злаков, причем даже в тех случаях, когда различий в наступлении фенофаз между опытными и контрольными растениями не наблюдается.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* L.; цинк; фенологические фазы развития; состояние апекса побега; этапы органоогенеза.

N. M. Kaznina, Yu. V. Batova, A. F. Titov. THE EFFECT OF ZINC EXCESS ON THE SHOOT APEX AND ORGANOGENESIS RATE IN BARLEY PLANTS

The effect of zinc excess in the root area (160 mg / kg substrate) on the state of the shoot apex and the rate of organogenesis in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) v. Nur during the stem elongation development phase was studied in a pot experiment. In 30-days-old plants at the beginning of this phase, zinc in the given concentration inhibited the shoot apex growth, hindered its differentiation, and delayed organogenesis. This effect is supposed to be associated with the direct action of the metal on the meristematic activity of apex cells, as well as its mediated action due to changes in cellular metabolism. In 45-days-old plants, when the stem elongation phase was completed, the negative effect of zinc on the shoot apex was leveled off, apparently due to the activation of in-

tracellular mechanisms of metal detoxification and, as a consequence, the recovery of cell meristematic activity. Owing to the shortening of the organogenesis stage VI, the experimental plants caught up with the control plants in their development and proceeded to stage VII of organogenesis almost simultaneously with them. It also follows from the obtained results that the morphophysiological method of monitoring the state of shoot apex and the rate of organogenesis allows one to quickly and quite reliably detect the effect of heavy metals on cereals development, even where there are no visible differences in the onset of phenophases between experimental and control plants.

Key words: *Hordeum vulgare* L.; zinc; phenological phases of development; stages of organogenesis; state of shoot apex.

Введение

Способность растений к постоянному росту связана с функционированием у них апикальных меристем корня и стебля, где происходят процессы, определяющие рост и морфогенез органов [Зубов, 2016]. Помимо этого, апикальные меристемы – это основные места синтеза таких фитогормонов, как цитокинины (апикальная меристема корня) и ауксины (апикальная меристема побега) [Полевой, Саламатова, 1991]. Известно, что меристематические клетки весьма чувствительны к различным видам стрессового воздействия, в частности, к высоким и низким температурам, засухе, засолению, повышенному уровню радиации [Довгальюк и др., 2001; Кравец и др., 2011; Feller et al., 2015]. Тяжелые металлы также оказывают негативное влияние на клетки апикальных меристем. Например, при повышении концентрации в корнеобитаемой среде кадмия и свинца замедляется интенсивность клеточных делений в меристеме корня душистого горошка [Бессонова, 1991] и кукурузы [Нестерова, 1991], а у паслена [Feller et al., 2015] и арабидопсиса [Yang, Huang, 2016] снижается количество клеток на всех фазах митоза и уменьшаются их размеры. Нами ранее был выявлен отрицательный эффект кадмия, свинца и цинка на рост и дифференциацию апикальной меристемы стебля у ячменя и овса [Казнина и др., 2006; Казнина, 2016]. Кроме того, было показано, что на основании наблюдений за состоянием апекса побега злаков и за темпами их органогенеза (с помощью морфофизиологического метода) можно с высокой степенью надежности судить о развитии растений в присутствии тяжелых металлов (по сравнению с общепринятой визуальной оценкой наступления отдельных фенологических фаз). Однако эти исследования ограничивались лишь начальными этапами онтогенеза. Данных о влиянии тяжелых металлов на состояние апекса побега на более поздних этапах развития, когда происходит закладка органов цветка

и формируется зачаточное соцветие, в известной нам литературе нет. Хотя такого рода сведения чрезвычайно важны, особенно в отношении злаков, поскольку успешное прохождение этих этапов является основой их будущей высокой семенной продуктивности [Чельцова, 1980].

В этой связи в задачу настоящего исследования входило изучение влияния избытка цинка, как одного из наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды из группы тяжелых металлов, на рост и дифференциацию апекса побега, а также на темпы органогенеза у растений ячменя во время прохождения ими фазы выхода в трубку, которая является у злаков наиболее продолжительной (начинаясь с инициации зачатков первых колосков и заканчиваясь гаметогенезом).

Материалы и методы

Растения ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Нур выращивали в условиях вегетационного опыта в сосудах с песком. Полив осуществляли питательным раствором Хогланда – Арнона с оптимальной концентрацией цинка (2 мкМ) (контроль). Избыток цинка создавали путем его одноразового внесения в песчаный субстрат в концентрации 160 мг/кг субстрата в виде сернокислой соли при закладке опыта. Объем питательного раствора для полива выбирался с учетом сохранения исходных концентраций цинка. Спустя 30 и 45 сут после посева у растений устанавливали фенологическую фазу, с использованием бинокулярной лупы МБС-10 измеряли длину апекса главного побега и количество колосков II порядка, а также определяли этап органогенеза [Куперман, 1984]. Повторность в пределах одного варианта опыта составляла 10 растений, весь опыт повторяли дважды. Достоверность различий между вариантами опыта оценивали с помощью критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$. На рисунках представлены средние значения и их стандартные ошибки.

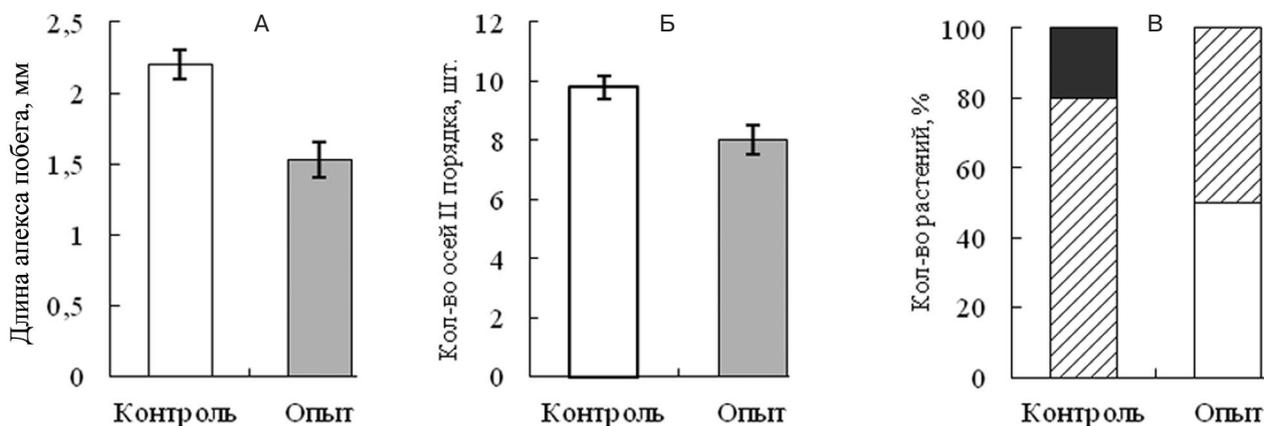


Рис. 1. Влияние избытка цинка (160 мг/кг субстрата) на длину апекса побега (А), количество осей II порядка (Б) и темпы органогенеза (Б) (□ – IV этап органогенеза; ▨ – V этап; ■ – VI этап) у растений ячменя сорта Нур в начале фазы выхода в трубку

Fig. 1. Impact of zinc excess (160 mg / kg substrate) on the shoot apex length (A), number of second-order axes (Б) and rate of organogenesis (Б) (□ – IV stage of organogenesis; ▨ – V stage; ■ – VI stage) in barley plants v. Nur at the beginning of the stem elongation development phase

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного исследования четко выраженных визуальных различий между растениями контрольного и опытного вариантов по наступившей фенологической фазе выявлено не было: через 30 сут после посева у всех растений зафиксировано начало фазы выхода в трубку. В то же время обнаружено отрицательное воздействие избытка цинка на рост и дифференциацию апекса побега. В частности, его длина у растений опытного варианта оказалась на 30 % меньше, чем в контроле (рис. 1, А). Уменьшалось также (почти на 20 % по сравнению с контролем) количество закладываемых на апексе побега осей II порядка (колосковых бугорков) – будущих элементов соцветия (рис. 1, Б). При этом наблюдалось и значительное замедление темпов органогенеза (рис. 1, В). Например, если в контроле у 80 % растений был отмечен V этап органогенеза, а у 20 % даже VI этап, то при избытке цинка в корнеобитаемой среде только половина растений достигли V этапа органогенеза, а остальные находились на IV этапе.

Спустя 45 сут от посева у растений обоих вариантов опыта было зафиксировано окончание фазы выхода в трубку. В это время ингибирующее действие металла на рост апекса побега несколько ослабевало. В частности, его длина у растений опытного варианта практически не отличалась от контроля (рис. 2, А). Не было обнаружено и отставаний в наступлении очередного этапа органогенеза: все растения находились на VII этапе (рис. 2, Б).

По аналогии с другими видами стрессовых воздействий торможение роста апекса побега

у ячменя в присутствии избытка цинка в корнеобитаемой зоне, очевидно, является следствием снижения меристематической активности клеток. Это может быть связано с увеличением продолжительности отдельных фаз митоза [Шматько и др., 1994] или с уменьшением в клетках апикальной меристемы содержания нуклеиновых кислот и белков [Аветисова, 1971]. Нельзя исключить и снижение обеспеченности меристематических клеток ассимилятами, что обусловлено отрицательным воздействием металла на фотосинтетический аппарат, а также элементами минерального питания вследствие нарушения процессов поглощения и транспорта ионов [Куперман, 1984]. Наконец, учитывая, что цинк способен накапливаться в апексе побега [Feller et al., 2015], возможно его прямое влияние на клеточное деление, в основе которого лежит связывание ионов металла с сульфгидрильными группами белков веретена и ферментов, ответственных за прохождение митоза [Иванов и др., 2003; Серегин, Кожевникова, 2006]. С другой стороны, хорошо известно, что при воздействии на растения тяжелых металлов в их клетках активируются различные защитные механизмы, обеспечивающие детоксикацию их ионов, в частности, связывание токсичных ионов в цитозоле хелаторами [Титов и др., 2014]. Очевидно, благодаря эффективному функционированию этих механизмов негативное влияние избытка цинка на меристематические клетки в процессе роста и развития ячменя постепенно снижалось, что привело к восстановлению активного деления клеток меристемы. Однако меньшее количество сформированных в эту фазу развития ко-

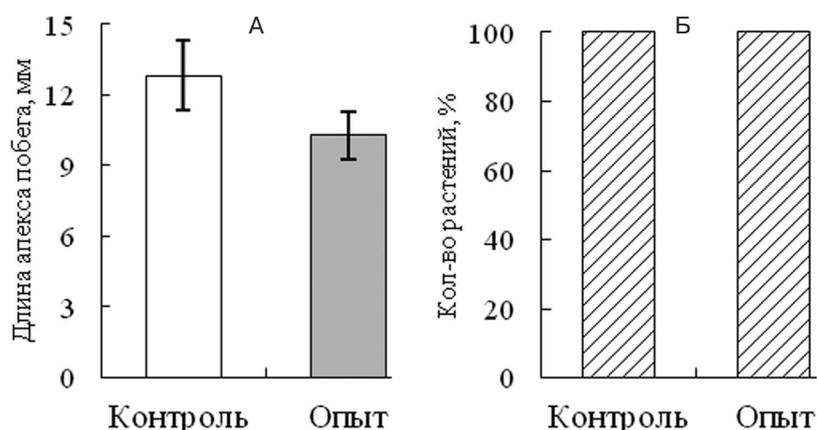


Рис. 2. Влияние избытка цинка (160 мг/кг субстрата) на длину апекса побега (А) и темпы органогенеза (Б) (□ – VII этап органогенеза) у растений ячменя сорта Нур в конце фазы выхода в трубку

Fig. 2. Impact of zinc excess (160 mg / kg substrate) on the shoot apex length (A) and rate of organogenesis (Б) (□ – VII stage of organogenesis) in barley plants v. Nur at the end of the stem elongation development phase

лосков II порядка, зафиксированное в нашем опыте, в дальнейшем неизбежно отрицательно отразится на размере колоса и семенной продуктивности растений [Казнина и др., 2006; Батова и др., 2012].

Необходимо отметить, что проведенные нами исследования затрагивали только одну фазу развития культурных злаков – фазу выхода в трубку. Однако в течение этого временного периода растения проходят четыре этапа органогенеза – с IV по VII, которые характеризуются серьезными изменениями в апексе побега. В частности, на IV этапе органогенеза происходит дифференциация апекса, образуются оси II порядка (будущие колоски). На V этапе наблюдается начало образования и дифференциации качественно новых органов – цветков, определяется потенциальная семенная продуктивность колоса. На VI–VII этапах органогенеза происходят процессы макро- и микроспорогенеза, формируются мужской и женский гаметофиты. VII этап органогенеза важен также тем, что в этот период усиленно растут в длину все элементы колоса [Куперман, 1984]. Установлено, что от успешного протекания этих процессов во многом зависит будущая семенная продуктивность злаков и любое стрессовое воздействие на растения на этих этапах развития может заметно снизить ее. Тем не менее, как показывают исследования, факторы окружающей среды, не выходящие за границы субповреждающих значений, в большинстве случаев вызывают лишь изменение продолжительности этапов органогенеза, и только сильные стрессовые воздействия приводят к его нарушениям [Казнина и др., 2006; Gol et al., 2017].

В частности, в наших опытах в присутствии избытка цинка в корнеобитаемой среде у ячменя несколько задерживалось наступление V этапа органогенеза. Однако в дальнейшем благодаря сокращению продолжительности VI этапа растения опытного варианта догоняли в своем развитии контрольные растения и переходили к VII этапу органогенеза практически одновременно с ними.

Заключение

Результаты проведенного исследования показывают, что избыток цинка в корнеобитаемой среде тормозит рост апекса побега у ячменя, негативно влияет на его дифференциацию и задерживает органогенез растений, что отчетливо проявляется в начале фазы выхода в трубку. Очевидно, это связано как с прямым воздействием металла на меристематическую активность клеток, так и с его опосредованным действием через изменение клеточного метаболизма. Однако в дальнейшем в процессе развития растений (в конце фазы выхода в трубку) негативный эффект цинка на изученные процессы нивелируется, что, по всей видимости, обусловлено активацией внутриклеточных механизмов детоксикации металла. В результате меристематическая активность клеток восстанавливается и апекс побега возобновляет свой рост. При этом за счет сокращения времени прохождения VI этапа органогенеза опытные растения догоняют в своем развитии растения контрольного варианта и переходят к VII этапу органогенеза практически одновременно с ними.

Проведенные исследования также подтвердили, что морфофизиологический метод наблюдения за состоянием апекса побега и темпами органогенеза у злаков позволяет быстро и с высокой степенью надежности выявлять воздействие тяжелых металлов на развитие растений даже в тех случаях, когда визуальные различия в наступлении фенофаз между опытными и контрольными вариантами отсутствуют.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0221-2017-0051).

Литература

Аветисова Л. В. Гистохимическое изучение конуса нарастания пшеницы в связи с задержкой роста и развития растений // Экспериментальная биология сельскохозяйственных растений. М.: Наука, 1971. С. 132–143.

Батова Ю. В., Лайдинен Г. Ф., Казнина Н. М., Титов А. Ф. Влияние загрязнения кадмием на семенную продуктивность однолетних злаков // Агрохимия. 2012. № 6. С. 74–79.

Бессонова В. В. Клеточный анализ роста корней *Lathyrus odoratus* L. при действии тяжелых металлов // Цитология и генетика. 1991. Т. 25, № 6. С. 18–24.

Довгалюк А. И., Калиняк Т. Б., Блюм Я. Б. Цитогенетические эффекты солей токсичных металлов в клетках апикальной меристемы корней проростков *Allium cepa* L. // Цитология и генетика. 2001. Т. 35, № 2. С. 3–10.

Зубов Д. А. Стволовые клетки растений и животных: две стороны одной медали. Ч. 1 // Гены и клетки. 2016. Т. XI, № 3. С. 14–22.

Иванов В. Б., Быстрова Е. И., Серегин И. В. Сравнение влияния тяжелых металлов на рост корня в связи с проблемой специфичности и избирательности их действия // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 3. С. 445–454.

Казнина Н. М., Лайдинен Г. Ф., Титов А. Ф. Влияние кадмия на апикальные меристемы стебля растений ячменя // Онтогенез. 2006. Т. 37, № 6. С. 444–448.

Казнина Н. М. Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы устойчивости

растений семейства *Poaceae* к тяжелым металлам: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. СПб., 2016. 48 с.

Кравец Е. А., Михеев А. Н., Овсянникова Л. Г., Гродзинский Д. М. Критический уровень радиационного повреждения апикальной меристемы корня и механизмы ее восстановления у *Pisum sativum* L. // Цитология и генетика. 2011. № 1. С. 24–34.

Куперман Ф. М. Морфофизиология растений. Морфофизиологический анализ этапов органогенеза различных жизненных форм покрытосеменных растений. М.: Высш. шк., 1984. 240 с.

Нестерова А. И. Изменение организации меристемы главных корней проростков кукурузы при действии некоторых тяжелых металлов // Современные проблемы экологии и анатомии растений: Материалы 2-го Всесоюз. совещ. (Владивосток, 10–16 сент. 1990 г.). Владивосток, 1991. С. 109–116.

Полевой В. В., Саламатова Т. С. Физиология роста и развития растений: Учеб. пособие. Л.: Изд-во ЛГУ, 1991. 239 с.

Серегин И. В., Кожевникова А. Д. Физиологическая роль никеля и его токсическое действие на высшие растения // Физиология растений. 2006. Т. 53, № 2. С. 285–308.

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

Чельцова Л. П. Рост конусов нарастания побегов в онтогенезе растений / Ред. А. А. Горшкова. Новосибирск: Наука, 1980. 192 с.

Шматько И. Г., Жук О. И., Молошага Н. В. Восстановительная способность стеблевых меристем озимой пшеницы после действия водного стресса // Физиология и биохимия культ. растений. 1994. Т. 26, № 2. С. 185–188.

Feller U., Anders I., Wei S. Effects of PEG-induced water deficit in *Solanum nigrum* on Zn and Ni uptake and translocation in split root systems // Plants. 2015. Vol. 4. P. 284–297. doi: 10.3390/plants4020284

Gol L., Tomé F., vonKorff M. Floral transitions in wheat and barley: interactions between photoperiod, abiotic stresses, and nutrient status // J. Exp. Bot. 2017. Vol. 68, no. 7. P. 1399–1410. doi: 10.1093/jxb/erx055

Yuan H. M., Huang X. Inhibition of root meristem growth by cadmium involves nitric oxide-mediated repression of auxin accumulation and signalling in Arabidopsis // Plant Cell Environ. 2016. Vol. 39. P. 120–135. doi: 10.1111/pce.12597

Поступила в редакцию 14.09.2018

References

Avetisova L. V. Gistokhimicheskoe izuchenie konusa narastaniya pshenitsy v svyazi s zaderzhkoi rosta i razvitiya rastenii [Histochemical study of the cone of wheat growth due to delayed growth and development of plants]. *Ekspierimental'naya biol. sel'skokh. rast.* [Experimental biol. of agricultural plants]. Moscow: Nauka, 1971. P. 132–143.

Batova Yu. V., Laidinen G. F., Kaznina N. M., Titov A. F. Vliyaniye zagryazneniya kadmиеm na semen-

nyuyu produktivnost' odnoletnikh zlakov [Influence of cadmium contamination on the seed productivity of annual cereals]. *Agrokhimiya* [Agrochemistry]. 2012. No. 6. P. 74–79.

Bessonova V. V. Kletochnyi analiz rosta kornei *Lathyrus odoratus* L. pri deistvii tyazhelykh metallov [Cellular analysis of root growth of *Lathyrus odoratus* L. under the action of heavy metals]. *Tsitologiya i genetika* [Cytol. Genet.]. 1991. Vol. 25, no. 6. P. 18–24.

Chel'tsova L. P. Rost konusov narastaniya pobegov v ontogeneze rastenii [Growth of shoot cones in plant ontogeny]. Novosibirsk: Nauka, 1980. 192 p.

Dovgalyuk A. I., Kalinyak T. B., Blyum Y. B. Tsitogeneticheskie efekty solei toksichnykh metallov v kletkakh apikal'noi meristemy kornei prorstkov *Allium cepa* L. [Cytogenetic effects of toxic metals salts in the root cells of the apical meristem of *Allium cepa* L. seedlings]. *Tsitologiya i genetika* [Cytol. Genet.]. 2001. Vol. 35, no. 2. P. 3–10.

Ivanov V. B., Bystrova E. I., Seregin I. V. Sravnenie vliyaniya tyazhelykh metallov na rost kornya v svyazi s problemoi spetsifichnosti i izbiratel'nosti ikh deistviya [Comparison of the influence of heavy metals on root growth in connection with the problem of specificity and selectivity of their action]. *Fiziol. rast.* [Russ. J. Plant Physiol.]. 2003. Vol. 50, no. 3. P. 445–454.

Kaznina N. M. Fiziologo-biokhimicheskie i molekulyarno-geneticheskie mekhanizmy ustoychivosti rastenii semeistva Poaceae k tyazhelym metallam [Physiological-biochemical and molecular-genetic mechanisms of Poaceae plants resistance to heavy metals]: Summary of PhD (Cand. of Biol.) thesis. St. Petersburg, 2016. 48 p.

Kaznina N. M., Laidinen G. F., Titov A. F. Vliyaniye kadmiya na apikal'nye meristemy stebly rastenii yachmenya [Influence of cadmium on apical stems of barley plants]. *Ontogenez* [Ontogenesis]. 2006. Vol. 37, no. 6. P. 444–448.

Kravets E. A., Mikheev A. N., Ovsyannikova L. G., Grodzinskii D. M. Kriticheskii uroven' radiatsionnogo povrezhdeniya apikal'noi meristemy kornya i mekhanizmy ee vosstanovleniya u *Pisum sativum* L. [Critical level of radiation damage to the apical root meristem and the mechanisms of its restoration in *Pisum sativum* L.]. *Tsitologiya i genetika* [Cytol. Genet.]. 2011. Vol. 1. P. 24–34.

Kuperman F. M. Morfofiziologiya rastenii. Morfofiziologicheskii analiz etapov organogeneza razlichnykh zhiznennykh form pokrytosemennykh rastenii [Morphophysiology of plants. Morphophysiological analysis of the organogenesis stages in various life forms of angiosperms]. Moscow: Vyssh. shk., 1984. 240 p.

Nesterova A. I. Izmenenie organizatsii meristemy glavnykh kornei prorstkov kukuruzy pri deistvii nekotorykh tyazhelykh metallov [Change in the organiza-

tion of the main roots meristem of maize seedlings under the action of some heavy metals]. *Sovremennyye probl. ekol. i anatomii rastenii: Mat-ly 2-go Vsesoyuz. soveshch. (Vladivostok, 10–16 sent. 1990 g.)* [Modern problems of plant ecology and anatomy: Proceed. 2nd All-Union Meeting (Vladivostok, Sept. 10–16, 1990)]. P. 109–116.

Polevoi V. V., Salamatova T. S. Fiziologiya rosta i razvitiya rastenii: ucheb. posobie [Physiology of plant growth and development: a textbook]. Leningrad: LGU, 1991. 239 p.

Seregin I. V., Kozhevnikova A. D. Fiziologicheskaya rol' nikelya i ego toksicheskoe deistvie na vysshie rasteniya [The physiological role of nickel and its toxic effect on higher plants]. *Fiziol. rast.* [Russ. J. Plant Physiol.]. 2006. Vol. 53, no. 2. P. 285–308.

Shmat'ko I. G., Zhuk O. I., Moloshaga N. V. Vosstanovitel'naya sposobnost' steblykh meristem ozimoi pshenitsy posle deistviya vodnogo stressa [Restorative capacity of winter wheat stem meristems after the action of water stress]. *Fiziol. i biokhim. kul't. rast.* [Physiol. and Biochem. of Cult. Plants]. 1994. Vol. 26, no. 2. P. 185–188.

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

Zubov D. A. Stvolovye kletki rastenii i zhivotnykh: dve storony odnoi medali. Ch. 1 [Stem cells of plants and animals: two sides of the same coin. Part 1]. *Geny i kletki* [Genes and Cells]. 2016. Vol. XI, no. 3. P. 14–22.

Feller U., Anders I, Wei S. Effects of PEG-induced water deficit in *Solanum nigrum* on Zn and Ni uptake and translocation in split root systems. *Plants*. 2015. Vol. 4. P. 284–297. doi: 10.3390/plants4020284

Gol L., Tomé F., vonKorff M. Floral transitions in wheat and barley: interactions between photoperiod, abiotic stresses, and nutrient status. *J. Exp. Bot.* 2017. Vol. 68, no. 7. P. 1399–1410. doi: 10.1093/jxb/erx055

Yuan H. M., Huang X. Inhibition of root meristem growth by cadmium involves nitric oxide-mediated repression of auxin accumulation and signalling in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 2016. Vol. 39. P. 120–135. doi: 10.1111/pce.12597

Received September 14, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Казнина Наталья Мстиславовна

ведущий научный сотрудник, д. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: kaznina@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 762706

CONTRIBUTORS:

Kaznina, Natalia

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

Батова Юлия Валерьевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: batova@krc.karelia.ru

Титов Александр Федорович

главный научный сотрудник отдела комплексных
научных исследований КарНЦ РАН, руководитель лаб.
экологической физиологии растений, чл.-корр. РАН,
д. б. н., проф.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru

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

Titov, Alexander

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

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

(требования к работам, представляемым к публикации
в «Трудах Карельского научного центра Российской академии наук»)

«Труды Карельского научного центра Российской академии наук» (далее – Труды КарНЦ РАН) публикуют результаты завершённых оригинальных исследований в различных областях современной науки: теоретические и обзорные статьи, сообщения, материалы о научных мероприятиях (симпозиумах, конференциях и др.), персоналии (юбилеи и даты, потери науки), статьи по истории науки. Представляемые работы должны содержать новые, ранее не публиковавшиеся данные.

Статьи проходят обязательное рецензирование. Решение о публикации принимается редакционной коллегией серии или тематического выпуска Трудов КарНЦ РАН после рецензирования, с учётом научной значимости и актуальности представленных материалов. Редакционные серии и отдельных выпусков Трудов КарНЦ РАН оставляют 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 редколлегией 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: 185000, 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 русском и английском языках (на отдельных листах); рисунки (на отдельных листах); подписи к рисункам на русском и английском языках (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, ученые 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 в 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 вкладышах (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. Заголовки таблиц, заголовки и содержание столбцов, строк, а также примечания приводятся на русском и английском языках. 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, двуязычные таблицы и подписи к рисункам, 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 приводятся на русском и английском языках, 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, детали на рисунках следует обозначать цифрами или буквами, значение которых также приводится в 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 groenlandicis* (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 общепотребительных.

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 его библиографическое описание вместо транслитерированного. Библиографические описания прочих работ приводятся на языке оригинала. Для составления списка рекомендуется использование бесплатных онлайн-сервисов транслитерации, вариант BSI.

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

Keywords: *Cucumis sativus* L.; temperature drop; resistance.

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ ТАБЛИЦЫ

Таблица 2. Ультраструктура клеток мезофилла листа в последствии 10-минутного охлаждения (2 °C) проростков или корней пшеницы

Table 2. Ultrastructure of leaf mesophyll cells after the exposure of wheat seedlings or roots to 10 min of chilling at 2 °C

Показатель Index	Контроль Control	Охлаждение проростков Seedling chilling	Охлаждение корней Root chilling
Площадь среза хлоропласта, мкм ² Chloroplast cross-sectional area, μm ²	10,0 ± 0,7	13,5 ± 1,1	12,7 ± 0,5
Площадь среза митохондрии, мкм ² Mitochondria cross-sectional area, μm ²	0,4 ± 0,03	0,5 ± 0,03	0,6 ± 0,04
Площадь среза пероксисомы, мкм ² Peroxisome cross-sectional area, μm ²	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Число хлоропластов на срезе клетки, шт. Number of chloroplasts in cell cross-section	9 ± 1	8 ± 1	10 ± 1
Число митохондрий на срезе клетки, шт. Number of mitochondria in cell cross-section	8 ± 1	8 ± 1	10 ± 1
Число пероксисом на срезе клетки, шт. Number of peroxisomes in cell cross-section	2 ± 0,3	2 ± 0,3	3 ± 0,4

Примечание. Здесь и в табл. 3: все параметры ультраструктуры измеряли через 24 ч после охлаждения.

Note. Here and in Tab. 3 all ultrastructure parameters were measured 24 h after chilling.

ОБРАЗЕЦ ОФОРМЛЕНИЯ ПОДПИСИ К РИСУНКУ

Рис. 1. Северный точильщик (*Hadrobregmus confuses* Kraaz.)

Fig. 1. Woodboring beetle *Hadrobregmus confuses* Kraaz.

Рис. 5. Результаты изучения кристаллитов и демпферных зон в образце кварца из Дульдурги:

(а) – электронная микрофотография кварца; (б) – картина микродифракции, полученная для участка 1 в области кристаллитов; (в) – картина микродифракции, отвечающая участку 2 в области демпферных зон

Fig. 5. Results of the study of crystallites and damping zones in a quartz sample from Duldurga:

(a) – electron microphotograph of the quartz sample; (б) – microdiffraction image of site 1 in the crystallite area; (в) – microdiffraction image corresponding to site 2 in the damping area

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.

В транслитерированном списке литературы:

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

В транслитерированном списке литературы:

Viktorov G. A. Mezhhvidovaya konkurentsia i sosushhestvovanie ehkologicheskikh gomologov u paraziticheskikh pereponchatokrylykh [Interspecific competition and coexistence ecological homologues in parasitic Hymenoptera]. *Zhurn. obshh. biol.* [Biol. Bull. Reviews]. 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.

В транслитерированном списке литературы:

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: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1985. 23 с.

Лозовик П. А. Гидрогеохимические критерии состояния поверхностных вод гумидной зоны и их устойчивости к антропогенному воздействию: Дис. ... докт. хим. наук. Петрозаводск, 2006. 481 с.

В транслитерированном списке литературы:

Sheftel' B. I. Ekologicheskie aspekty prostranstvenno-vremennykh mezhhvidovykh vzaimootnoshenii zemlerоек Srednei Sibiri [Ecological aspects of spatio-temporal interspecies relations of shrews of Middle Siberia]: Summary of PhD (Cand. of Biol.) thesis. Moscow, 1985. 23 p.

Lozovik P. A. Gidrogeokhimicheskie kriterii sostoyaniya poverkhnostnykh vod gumidnoi zony i ikh ustoichivosti k antropogennomu vozdeistviyu [Hydrogeochemical criteria of the state of surface water in humid zone and their tolerance to anthropogenic impact]: DSc (Dr. of Chem.) thesis. Petrozavodsk, 2006. 481 p.

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.

В транслитерированном списке литературы:

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.

В транслитерированном списке литературы:

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: 25.12.2015).

Демография. Официальная статистика / Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс]. URL: <http://www.gks.ru/> (дата обращения: 25.12.2015).

В транслитерированном списке литературы:

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).

Demografija. 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.

В транслитерированном списке литературы:

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. ORGANIC CATION TRANSPORTERS OF THE SLC22 FAMILY. MOLECULAR DIVERSITY, STRUCTURE, FUNCTION, PARTNERSHIP IN THE FUNCTIONING OF THE INTERORGAN COMMUNICATION SYSTEM OF ANIMALS (A REVIEW)	3
T. G. Shibaeva, E. N. Ikkonen, E. G. Sherudilo, A. F. Titov. PLANT RESPONSES TO A DAILY TEMPERATURE DROP OF DIFFERENT INTENSITY AND DURATION	20

ORIGINAL PAPERS

S. P. Rozhkov, A. S. Goryunov. CONFORMATIONAL EFFECTS OF SERUM ALBUMINE INTERACTION WITH NANOPARTICLES OF CARBON SHUNGITE: EPR SPIN PROBING DATA	38
A. E. Bakhvalova, S. A. Murzina, V. P. Voronin, S. N. Pekkoeva, T. P. Ruokolainen, D. L. Lajus, T. S. Ivanova, N. N. Nemova. THE DYNAMICS OF LIPIDS AND SOME FATTY ACIDS IN THE MUSCLES OF THE WHITE SEA THREESPINE STICKLEBACK DURING SHORT-TERM FASTING AND UNDER DIFFERENT FEEDING REGIMENS	51
K. M. Nikerova, N. A. Galibina, Yu. L. Moshchenskaya, L. L. Novitskaya, M. N. Podgornaya, I. N. Sofronova. QUERCETIN OXIDATION BY KARELIAN BIRCH PEROXIDASE	65
V. B. Pridacha, G. P. Tikhova, T. A. Sazonova. THE EFFECT OF ABIOTIC FACTORS ON WATER EXCHANGE IN CONIFEROUS AND DECIDUOUS PLANTS	76
A. A. Kochneva, E. V. Borvinskaya, D. S. Bedulina, I. V. Sukhovskaya. A COMPARISON OF THE PROTEIN PROFILE OF <i>TRIAENOPHORUS NODULOSUS</i> PLEROCERCOIDS FROM DIFFERENT INTERMEDIATE HOSTS	87
V. K. Bolondinskii, L. M. Vilikainen. GASEOUS CO ₂ EXCHANGE IN SILVER BIRCH SAPLINGS GROWING UNDER DIFFERENT LEVELS OF NITROGEN SUPPLY.	99
E. A. Khizhkin, A. V. Gulyavina, V. A. Ilyukha, I. A. Vinogradova, A. V. Morozov, E. S. Bruler. AGE-RELATED CHANGES IN THE BEHAVIOR AND PHOBIC ANXIETY REACTIONS IN RATS UNDER EXPOSURE TO LIGHT DEPRIVATION AND LUZINDOLE	110

SHORT COMMUNICATIONS

I. V. Baishnikova, L. B. Uzenbaeva, V. A. Ilyukha, A. G. Kizhina, E. F. Pechorina, T. N. Ilyina. BLOOD LEUKOCYTES AND MORPHOMETRIC PARAMETERS OF LYMPHOCYTES AT DIFFERENT DOSES OF VITAMINS A AND E IN AMERICAN MINKS (<i>NEOVISON VISON</i>).	125
N. M. Kaznina, Yu. V. Batova, A. F. Titov. THE EFFECT OF ZINC EXCESS ON THE SHOOT APEX AND ORGANOGENESIS RATE IN BARLEY PLANTS.	133
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	140

Научное издание

**Труды Карельского научного центра
Российской академии наук**
№ 12, 2018

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

*Печатается по решению Ученого совета
Федерального исследовательского центра
«Карельский научный центр Российской академии наук»*

Выходит 12 раз в год

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций
Регистрационная запись ПИ № ФС 77-72429 от 28.02.2018 г.

Редактор А. И. Мокеева
Компьютерная верстка Г. О. Предтеченский

Подписано в печать 21.12.2018. Дата выхода 31.12.2018. Формат 60x84¹/₈.
Печать офсетная. Уч.-изд. л. 16,7. Усл. печ. л. 19,4.
Тираж 100 экз. Заказ 531. Цена свободная

Учредитель и издатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук»
185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

Оригинал-макет: Редакция научного издания «Труды КарНЦ РАН»

Типография: Редакционно-издательский отдел КарНЦ РАН
185003, г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50