

Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр
Российской академии наук»

ТРУДЫ

КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

№ 6, 2019

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ

Петрозаводск
2019

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.

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.

Издается с января 2009 г.

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>; <http://journals.krc.karelia.ru>

© ФИЦ «Карельский научный центр РАН», 2019
© Институт биологии КарНЦ РАН, 2019
© Институт леса КарНЦ РАН, 2019

Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences

TRANSACTIONS

**of the KARELIAN RESEARCH CENTRE
of the RUSSIAN ACADEMY of SCIENCES**

No. 6, 2019

EXPERIMENTAL BIOLOGY

Petrozavodsk
2019

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.

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.)

Published since January 2009

Monthly

Editorial Office address: 11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia

Tel. (8142)762018; fax (8142)769600

E-mail: trudy@krc.karelia.ru

Full-text electronic version: <http://transactions.krc.karelia.ru>; <http://journals.krc.karelia.ru>

© Karelian Research Centre, Russian Academy
of Sciences, 2019

© Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian
Academy of Sciences, 2019

© Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences, 2019

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.3

ФАЗОВЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВЫХ РАСТВОРОВ И ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКА

С. П. Рожков, А. С. Горюнов

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

Образование белковых конденсированных фаз (кристаллов, олигомеров, других твердотельных агрегатов, а также плотных жидкостей и гелей), в том числе безмембранных микроскопических и наноразмерных фаз, играет важную роль в функциональной активности белка в цитоплазме живой клетки, является значимым аспектом белковых исследований и биотехнологий, а также обуславливает различные патологии в живом организме. Многие явления, связанные с образованием интермедиатов сворачивания белковых молекул, до сих пор не получили термодинамической трактовки. Это снижает предсказательный потенциал фазовых диаграмм состояний белкового раствора, используемых для описания состояния молекул белка в разнообразных физиологических и биотехнологических условиях. В работе делается попытка проследить взаимосвязь фазовых переходов типа жидкость-жидкость (L–L) в дисперсиях глобулярных белков с явлениями тепловой и холодной денатурации. Показано, что анализ изобар фазовой диаграммы в координатах давление – температура и температура – энтропия позволяет предсказать появление новых фазовых состояний, образованных интермедиатами сворачивания, в дисперсии белка. Они находятся в метастабильном равновесии с макрофазой, образованной нативными или денатурированными формами молекул белка. Термодинамическое равновесие достигается за счет того, что интермедиаты сворачивания образуют фазы микроскопических размеров, которые стабилизируются за счет капиллярного эффекта. Тем самым при одном и том же внешнем давлении, действующем на дисперсию, обеспечивается равенство химических потенциалов всех молекул белка, необходимое для термодинамической устойчивости системы. Вне денатурационного температурного интервала интермедиаты приобретают основную конформацию и происходит фазовый переход типа L–L, так как исчезают причины, вызывающие необходимость фазового разделения. Такой подход позволил также показать, что метастабильные фазовые равновесия нативный белок – интермедиат и денатурированный белок – интермедиат имеют признаки равновесия типа L–L в области как низких, так и повышенных температур, и объяснить их существование вдали от области фазового перехода первого рода.

Ключевые слова: фазовые диаграммы белкового раствора; тепловая и холодная денатурация белка; бинадаль; интермедиаты сворачивания белка; фазовые переходы; капиллярное давление.

S. P. Rozkov, A. S. Goryunov. PHASE PROPERTIES OF PROTEIN SOLUTIONS AND PROTEIN DENATURATION

The formation of protein-containing condensed phases (crystals, oligomers, other solid aggregates, as well as dense liquids and gels), including membraneless micro and nano-phases, plays an important role in the functional activity of proteins in the cytoplasm of a living cell, presents a significant aspect of protein studies and biotechnologies, and causes various pathologies in a living body. Numerous phenomena bound to the arising of the folding intermediates of protein molecules do not appear to have been thermodynamically defined so far. This reduces the predictive power of the phase diagrams of protein solution states used to describe the state of the protein molecule in various physiological and biotechnological conditions. This paper is aimed at examining the relationship of liquid-liquid (L–L) type phase transitions of globular protein solutions with the phenomena of thermal and cold denaturation. We have shown that the analysis of phase diagram isobars in pressure-temperature and temperature-entropy coordinates allows predicting the new phase states formed by folding intermediates in protein dispersion. They are in metastable equilibrium with the macroscopic phase formed by native and denatured forms of protein molecules. Thermodynamic equilibrium is established due to the formation of microscale phases containing folding intermediates. They are stabilized by the capillary effect. This ensures the equality of the chemical potentials of all protein molecules with the same external pressure acting on the dispersion, which is a necessary condition for the stability of the system. The intermediates take the basic configuration outside the denaturation temperature range, and the L–L phase transition occurs, since there are no longer reasons for phase separation. This allows us to conclude that the metastable native protein – intermediate and denatured protein – intermediate phase equilibria have properties of L–L type equilibrium in the range of both low and high temperatures, and to explain the presence of such equilibria in the region of first-order phase transitions.

Key words: phase diagrams of protein solution; thermal and cold denaturation of protein; binodal; protein folding intermediates; phase transitions; capillary pressure.

Введение

Способность цитоплазмы в определенных условиях образовывать микроскопические фазы – органеллы, не ограниченные липидными мембранами или иными мембранными структурами [Human et al., 2014; Shin, Brangwynne, 2017], привлекает в последние годы все более пристальное внимание. Это обусловлено как накопившимися свидетельствами существования таких фаз, представленными в работах школы Насонова [Александров, 1985] и Линга [2008], так и их важной биологической ролью в осуществлении внутриклеточных транспортных, регуляторных, структурных функций [Matveev, 2005; Yewdall et al., 2018]. Параллельно этим работам и независимо от них шло изучение фазовых переходов (ФП) типа жидкость-жидкость (L–L) в дисперсиях белков [Asherie, 2004; Dumetz et al., 2008; Vekilov, 2012]. Эти ФП проявляются образованием микроскопических и/или наноразмерных капель (фаз) белка с концентрацией молекул большей, чем средняя по объему, то есть более плотных, чем окружающая дисперсия. На фазовой диаграмме (ФД) состояний белкового раствора эти образования возникают в состояниях, отображаемых

точками в области линии бинодали – кривой, разделяющей области устойчивого и неустойчивого (метастабильного) равновесия дисперсии [Yaminsky et al., 2002; Gillespie et al., 2014]. Были выяснены закономерности многоступенчатой нуклеации [Vorontsova et al., 2015], внесшие значительный вклад в понимание механизмов кристаллизации белка [Gebauer et al., 2014]. Накопленные знания о механизмах ФП типа L–L могут служить основой для описания и моделирования фазовых явлений в цитоплазме. Но для этого необходимо изучить взаимосвязь между ФП и структурно-конформационными изменениями в макромолекулах белков.

Взаимодействие глобулярных белков в растворе достаточно хорошо описывается в рамках представления о твердых сферах с короткодействующим потенциалом притяжения, действующего на коротких расстояниях около четверти диаметра частицы [Asherie, 2004]. Это объясняет существование ФП типа L–L и фазовых состояний, метастабильных по отношению к твердой фазе. При этом, однако, не учитывается множество других факторов, рассмотрение которых должно бы существенно дополнить картину взаимодействий между макромолекулами. Важнейшие среди них, но до сих пор

почти не принимавшиеся во внимание – это конформационное состояние молекулы белка и его роль в ФП, наличие «горячих» участков, обеспечивающих анизотропное взаимодействие [Lomakin et al., 1999].

Структурно-динамическое состояние белковых молекул в значительной степени определяется температурой. Важнейшими с этой точки зрения являются диапазоны тепловой и холодной денатурации и соответствующие структурно-динамические состояния белка (состояние D – тепловая денатурация и состояние D* – холодная денатурация). В интервале между ними состояние молекул белка описывается как нативное (состояние N), если белок не принадлежит к классу белков с внутренне неупорядоченной структурой (intrinsically disordered proteins, IDP). Сами же денатурационные переходы происходят по типу фазовых переходов 1-го рода [Финкельштейн, 2002]. Вместе с тем при приближении к температуре денатурации с любой стороны в дисперсии могут наблюдаться молекулы белка в состоянии с частично развернутой структурой – метастабильные интермедиаты сворачивания. В высокотемпературной области они наиболее известны как расплавленная и предрасплавленная глобула. Структура первой – ближе к состоянию N, а структура второй – к состоянию D [Bian, Ji, 2014]. Мольная доля интермедиатов может быть достаточно высока (до 0,4). Это позволяет регистрировать их экспериментально в физиологических условиях наряду с N и D состояниями [Nakamura et al., 2007] путем подбора условий (pH, солевой состав), в которых они приобретают относительную устойчивость или метастабильность по отношению к N и D. Химические потенциалы интермедиатов в таких равновесных состояниях и молекул в N и D состояниях в смеси должны быть равны [Рожков, Горюнов, 2017]. Это возможно, если интермедиаты способны организоваться в отдельные микрофазы – капли или пузыри, с концентрацией белка большей или меньшей, чем средняя по объему, соответственно. За счет дополнительного капиллярного (лапласова) давления в таких микрофазах химический потенциал интермедиатов μ_i может сравняться с таковым для N и D состояний:

$$\mu_i(P \pm \Delta P) = \mu_N(P) = \mu_D(P).$$

При этом внешнее давление P для всех фаз раствора может оставаться одинаковым. Теоретический анализ роли давления и температуры {PT} на конформационное состояние молекул белка часто проводится на основе эллиптической фазовой диаграммы (ФД)

Тамманна в форме скошенного эллипсоида. Такая диаграмма используется для описания самых разных физических явлений, сопряженных с реэнтрантными фазовыми переходами в многокомпонентных системах [Johari, 2001; Heremans, 2005]. Ранее нами было показано [Рожков, Горюнов, 2017], что ФД в координатах давление – температура {PT} может быть преобразована в координаты температура – энтропия {TS}. Это позволяет выявлять новые фазы раствора белка, которые не проявляются в системе на обычной ФД в координатах {TP}. ФД дисперсий глобулярных белков в координатах {PT} хорошо описывает разнообразные экспериментальные результаты, что многократно подтверждено работами, в которых в качестве параметра использовалось давление [Dave, Gruebele, 2015]. В то же время поведение белков с внутренне неупорядоченной структурой, интермедиатов сворачивания, олигомеров и агрегатов белка до сих пор не описано ФД такого типа сколько-нибудь полно [Badasyan et al., 2015]. Роль же капиллярных эффектов, создающих внутреннее давление в микрофазах, до сих пор рассматривалась лишь по отношению к ядрам нуклеации [Cacciuto, Frenkel, 2005].

Цель работы состояла в том, чтобы показать наличие взаимосвязи между процессами денатурации белка и фазовыми переходами типа L–L белкового раствора, между интермедиатами и состояниями N и D белковых молекул во всем диапазоне существования раствора глобулярного белка между температурами тепловой и холодной денатурации. Для этого использовали эллиптическую ФД в координатах {TS}, трансформированную из ФД {PT} путем изобарических сечений. На этой основе провели качественный термодинамический анализ возможных фазовых состояний в области тепловой и холодной денатурации с учетом представления об интермедиатах сворачивания.

Фазовые диаграммы белковых дисперсий

ФД в координатах температура – давление

На рис. 1 схематически представлена диаграмма Тамманна, отражающая тепловую, холодную и вызываемую давлением денатурацию белков. Линия эллипса образована точками, в которых выполняется условие $\Delta G_N^D = G^D - G^N = 0$, что соответствует ФП 1-го рода, в данном случае – N ↔ D. Важными элементами этой ФД являются «нейтральные линии», соединяющие точки, в которых выполняются

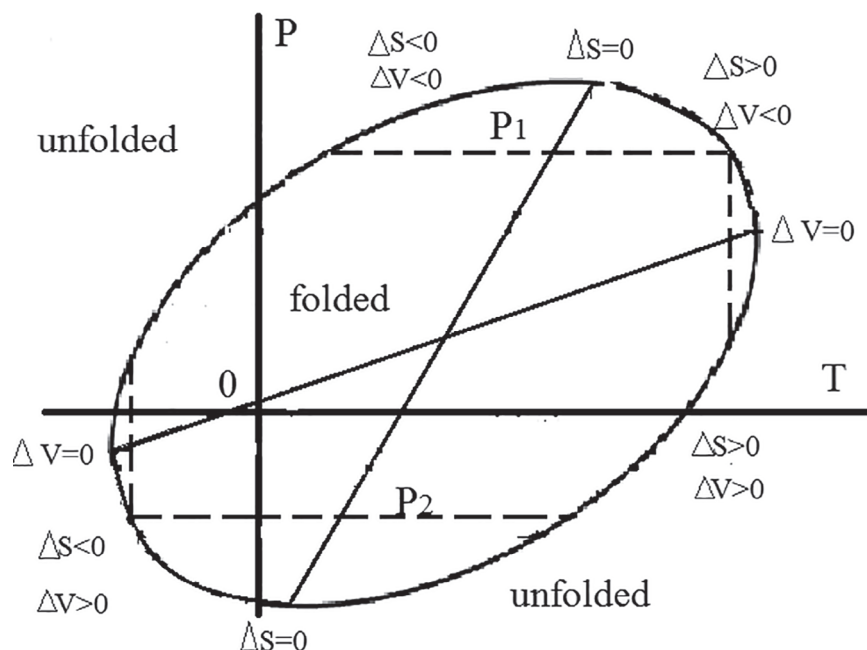


Рис. 1. Схематическое представление эллиптической фазовой диаграммы состояний белкового раствора в координатах давление P – температура T {PT}. P₁ и P₂ – сечения эллипса изобарами, используемые для анализа. Вдоль кривой эллипса указаны значения объема ΔV и энтропии ΔS в различных точках и участках кривой. Внутри эллипса состояние белка свернутое, снаружи – развернутое

Fig. 1. Schematic presentation of the elliptic phase diagram of protein solution states in pressure P – temperature T {PT} coordinates. P₁ and P₂ are the sections of the ellipse by isobars used for analysis. The values of volume ΔV and entropy ΔS are indicated at various points and sections along the ellipse curve. The structure of the protein corresponds to folded state inside the ellipse, and it is unfolded outside the ellipse

условия $\Delta S_N^D = S^D - S^N = 0$ и $\Delta V_N^D = V^D - V^N = 0$. Точки $\Delta S_N^D = 0$ соответствуют температурам, при которых N→D переход происходит при минимальном и максимальном давлении, а $\Delta V_N^D = 0$ – при крайних температурах. На дугах эллипса между этими точками ΔS_N^D и ΔV_N^D не равны нулю. Сечения эллипса изобарами P₁ и P₂ показывают, что $dP/dT = 0$ в точке, где $\Delta S_N^D = 0$, и $dP/dT \rightarrow \infty$ в точке $\Delta V_N^D = 0$. Однако области, где $dP/dT < 0$ в верхней и нижней части эллипса, до сих пор не имели объяснения в рамках механизма сворачивания (фолдинга) белка [Meersman et al., 2006].

ФД в координатах температура – концентрация

Классические варианты ФД для концентрированных растворов глобулярного белка [Dumetz et al., 2008; Vekilov, 2012] используются для отображения фазовых равновесий и ФП таких типов, как жидкость – твердое тело (L–S), жидкость – метастабильная плотная жидкость (L–L) с критической точкой, а также золь – гель.

ФД позволяют считать, что в сверхкритической области могут образовываться мезоскопические динамические кластеры белка и олигомеры, хотя природа этого процесса еще не вполне понятна [Vekilov, 2012].

До недавнего времени теоретический анализ с использованием фазовых диаграмм проводился преимущественно для белковых растворов с верхней критической температурой растворения (ВКТП) и нормальной растворимостью [Dumetz et al., 2008; Vekilov, 2012]. Однако экспериментальные исследования, направленные на конструирование ФД, свидетельствуют, что одна часть белков образует растворы с ВКТП, а другая – с нижней критической температурой растворения (НКТП) [Grouazel et al., 2006]. Имеются экспериментальные данные, в частности данные по альбумину в присутствии полимеров [Wang, Annunziata, 2007], о том, что один и тот же белок может образовать растворы как с ВКТП, так и с НКТП в зависимости от условий эксперимента. Ранее мы обосновали такую возможность теоретически [Рождков, Горюнов, 2017].

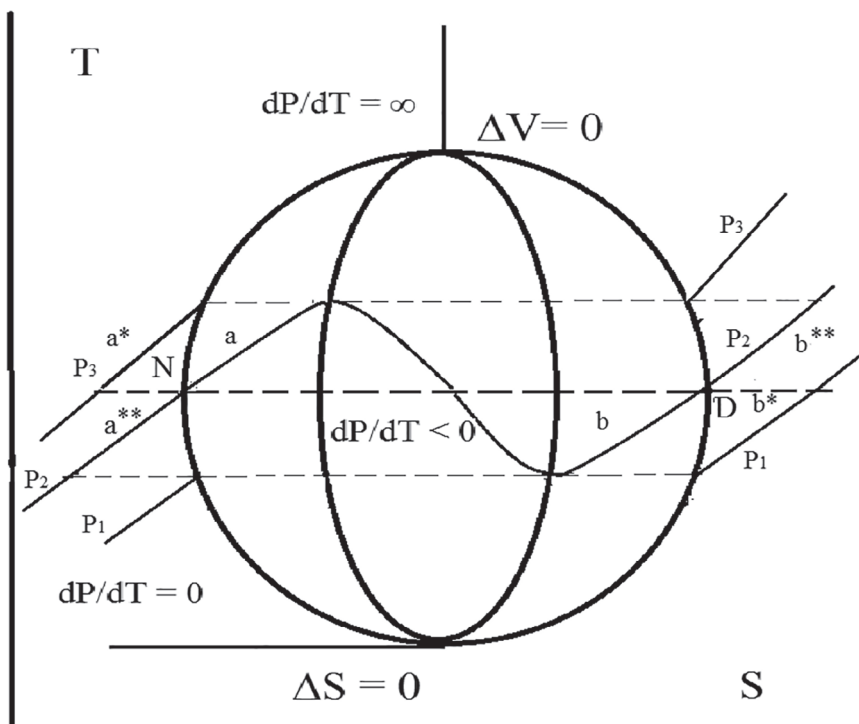


Рис. 2. Фазовая диаграмма (ФД) состояний белкового раствора в координатах температура – энтропия {TS}, объясняющая существование между точками $\Delta S_N^D = 0$ и $\Delta V_N^D = 0$ на эллиптической ФД (рис. 1) области $dP/dT < 0$ в диапазоне повышенных температур и давлений. Линии изобар P_1, P_2, P_3 соответствуют давлению, возрастающим от P_1 к P_3 ; внешний и внутренний эллипсы – линии бинадали и спинодали соответственно

Fig. 2. Phase diagram (PD) of protein solution states in temperature T – entropy S {TS} coordinates, explaining the presence of the zone $dP/dT < 0$ between the points $\Delta S_N^D = 0$ and $\Delta V_N^D = 0$ on the elliptic PD (Fig. 1) in the higher temperature and pressure range. The isobar lines P_1, P_2, P_3 correspond to the pressures that rise from P_1 to P_2 ; the outer and inner ellipses are binodal and spinodal lines respectively

Анализ ФД в координатах температура – энтропия

Бинадаль и спинадаль для интермедиатов белка в высокотемпературной области

Рассмотрим часть эллиптической ФД белкового раствора (рис. 1), ограниченную точками $\Delta S_N^D = 0$ и $\Delta V_N^D = 0$, в диапазоне высоких температур и давлений, где $dP/dT < 0$, а $\Delta S_N^D > 0$. На ФД в координатах температура – энтропия {TS} (рис. 2) соответствующая часть (дуга) эллипса может быть представлена следующим образом.

На изобаре P_2 показан фазовый переход $N \leftrightarrow D$ 1 рода, сопровождающийся скачком энтропии. При этом то, что отрезки a и b заходят в область бинадали (внешний эллипс), отражает возможность существования метастабильных состояний белка типа «перегретого» нативного (расплавленная глобула) или «переохлажденного» денатурированного (предрас-

плавленная глобула) при давлении P_2 . Будем считать их интермедиатами сворачивания. Для их возникновения переход $N \leftrightarrow D$ не обязателен. Они могут существовать в равновесии с молекулами белка в состояниях N и D, если изолированы от них в отдельные микроскопические фазы. В них интермедиаты будут находиться под следующим давлением:

$$P_3 = P_2 + 2\sigma/R_1 \quad (1)$$

и

$$P_1 = P_2 - 2\sigma/R_2 \quad (2)$$

В первом случае основная фаза, окружающая микрофазы, будет представлена молекулами в состоянии N (давление P_2 , отрезок a^{**}), и в ней будут находиться микрофазы с молекулами белка, близкими к «перегретому» состоянию N. Давление в микрофазах – P_3 (отрезок a^*). Во втором случае основная фаза содержит молекулы белка в состоянии D (давление P_2 , отрезок b^{**}), и в ней – микрофазы с молекулами

белка в состоянии, близком к «переохлажденному» состоянию D, под давлением P_1 (отрезок b^*). Тогда может выполняться условие:

$$\mu(N) = \mu(D) = \mu(P_2) = \mu(P_1) \quad (3)$$

при внешнем $P_2 = \text{const}$, $T = \text{const}$. Знак лапласова давления зависит от концентрации интермедиатов в микрофазе в сравнении с основной фазой. Потенциал взаимодействия между макромолекулами в микрофазах имеет в этой связи определяющее значение. Потенциал притяжения соответствует более плотной с точки зрения концентрации макромолекул микрофазе. Здесь из-за взаимодействия белок-белок макромолекулы менее гидратированы, чем в основной фазе. В этом случае объемная плотность самих молекул воды в микрофазе меньше, чем в основной фазе. Моделью такого состояния может служить пузырек пара в жидкости. Он может оставаться в равновесии с жидкостью, если давление Лапласа (отрицательное) компенсирует внешнее давление когезионных сил жидкости. Потенциал отталкивания соответствует менее плотной с точки зрения концентрации макромолекул, но более плотной (гидратированной) с точки зрения содержания воды микрофазе. Моделью этого состояния может служить капля жидкости в паре. Лапласово давление (положительное) будет направлено внутрь капли, препятствуя испарению.

Для молекул лизоцима показано, что вблизи фазового перехода $N \leftrightarrow D$ наряду с молекулами белка в состояниях N и D регистрируются два интермедиата белка. В случае других ферментов регистрируется либо от одного до трех интермедиатов, либо их полное отсутствие [Bian, Ji, 2014]. Вероятно, это зависит от возможности образования микрофазы определенного размера в данных условиях, что связано с конечным числом интермедиатов и их удельной поверхностной энергией. При изучении процессов агрегации лизоцима было обнаружено, что в денатурационном интервале температур белок образует криволинейные фибриллы, олигомеры, мономеры, жесткие фибриллы и преципитат. Если мономеры и жесткие фибриллы являются равновесными состояниями, то олигомеры и криволинейные фибриллы – метастабильные образования [Miti et al., 2015]. В таких асимметричных молекулярных системах, как криволинейные фибриллы, второй вириальный коэффициент положителен. Это позволяет предположить, что фибриллы формируют микроскопические фазы с потенциалом отталкивания. Наличие же преципитата свидетельствует о том, что имеет место также спиноподобный распад.

О возможном наличии равновесия интермедиатов с основными фазами раствора можно судить и непосредственно по рис. 1. Пусть P_0 – внешнее давление (атмосферное), при котором находится раствор белка. Пересечения изобары с дугами эллипса при низких и высоких температурах со стороны фазы N соответствуют $N \leftrightarrow D$ фазовым переходам. Однако изотермы для фазы N при пересечении с дугами эллипса при других давлениях (пунктир на рис. 1) попадают в диапазон температур и давлений, соответствующих условию $dP/dT < 0$. Это отвечает условию равновесия основной фазы раствора, находящейся под давлением P_0 , с микрофазой интермедиатов, находящейся также под давлением Лапласа. Но если в области высоких температур давление Лапласа положительно, то в области низких температур – отрицательно. Отрицательное давление Лапласа сопряжено с наличием короткодействующего потенциала притяжения между молекулами белка. С другой стороны, наличие такого потенциала обеспечивает фазовые переходы типа L–L для систем с ВКТП.

Уменьшение числа интермедиатов с понижением температуры (или повышением температуры для систем с отрицательным давлением Лапласа, горизонтальные пунктирные изобары на рис. 1) приводит к тому, что эти метастабильные фазы постепенно исчезают и остается основная фаза из N-молекул. Это равносильно критическому фазовому переходу типа L–L с НКТП и ВКТП соответственно.

Продолжение изобар P_1 в сторону более низких температур на рис. 1 показывает, что $N \leftrightarrow D$ переход происходит без участия интермедиатов, так как здесь $dP/dT > 0$. Вместе с тем состояния D молекул могут существовать в диапазоне физиологических температур, что характерно для молекул белков с внутренне неупорядоченной структурой.

Биноподаль и спиноподаль для интермедиатов белка в низкотемпературной области

Аналогично можно рассмотреть и часть эллиптической ФД, где $dP/dT < 0$, с той разницей, что здесь $\Delta S_N^D < 0$. В этом случае состояния D будут находиться слева по шкале энтропии, а состояния N – справа. Кроме того, точки $\Delta S_N^D = 0$ окажутся в нижней части шкалы температур, а $\Delta V_N^D = 0$ – в верхней. Все это означает, что интермедиаты молекул белка в фазе N будут находиться в более плотном состоянии под действием потенциала притяжения. Это согласуется с данными теоретических и экспериментальных исследований фазовых переходов типа L–L в белковых системах с ВКТП.

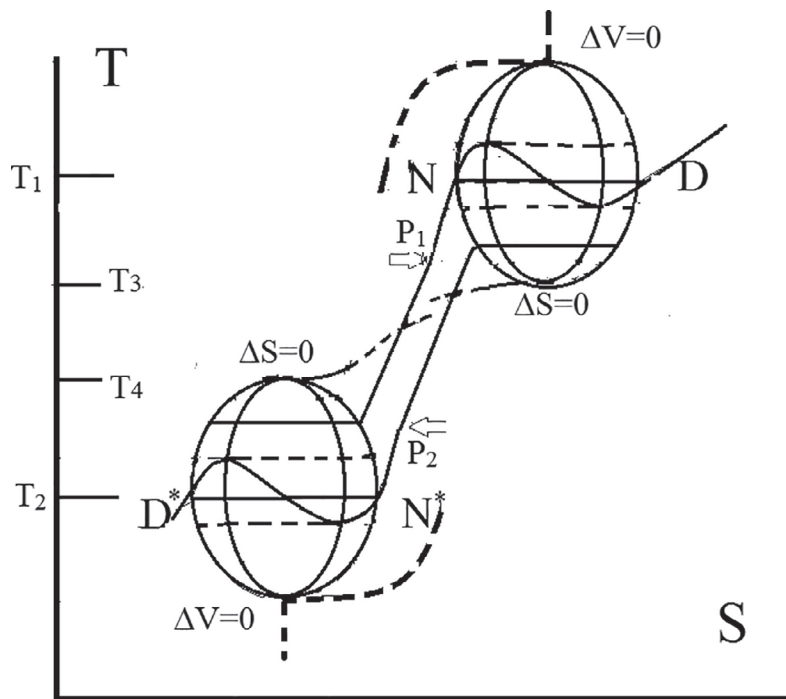


Рис. 3. Схематическое представление фазовой диаграммы состояний белкового раствора в координатах температура – энтропия {TS} в диапазоне между температурами холодной D* и тепловой D денатурации. N* и N низко- и высокотемпературные конформеры нативного белка, ΔV и ΔS – изменения объема и энтропии молекул белка соответственно P_1 и P_2 -изобары.

Fig. 3. Schematic presentation of the phase diagram of protein solution states in temperature T – entropy S {TS} coordinates in the range between cold D* and thermal D denaturation temperatures. N* and N are the low and high- temperature conformers of native protein, ΔV and ΔS are the volume and entropy changes of protein molecules, P_1 and P_2 are isobars

Представленные рассуждения предлагают лишь вероятный вариант образования фаз, сформированных интермедиатами, поскольку для образования микрофаз интермедиатов определенного радиуса необходимы соответствующие условия. Например, фаза интермедиата с повышенным давлением (ур. 1) будет стабильна, если радиус флуктуации концентрации вещества достигнет значения ур. 2. В терминах химических потенциалов [Базаров, 1991]

$$R_{cr.} = 2\sigma V_1 / (\mu_1 - \mu_2), \quad (4)$$

где μ_1 и μ_2 – химические потенциалы интермедиата и нативной молекулы соответственно. Чем меньше их разность, тем больше должен быть радиус зародыша, чтобы образование фаз по компенсационному механизму [Рожков, 2001; Rozhkov, 2004] было энергетически выгодно. Поскольку это связано с удельной поверхностной энергией, то наличие в дисперсии поверхностно активных веществ может оказывать существенное влияние на процессы фазообразования.

Гипотетическая фазовая диаграмма в координатах температура – энтропия во всем диапазоне температур существования белкового раствора

На рис. 3 представлена гипотетическая фазовая диаграмма в координатах температура – энтропия, охватывающая весь диапазон изменения термодинамических переменных P и T (рис. 1), т. е. весь диапазон существования белкового раствора между температурами тепловой и холодной денатурации. Две дуги эллипса, где $dP/dT < 0$ и существуют интермедиаты, представлены двумя замкнутыми фигурами в координатах температура – энтропия, разделенными диапазоном температур, заключенным между точками $\Delta S_N^D = 0$ на рис. 1 внизу. В них $dP/dT = 0$. Нижней и верхней максимальным температурам соответствуют точки $\Delta V_N^D = 0$. В них $dP/dT = \infty$.

Состояния D* и N* при низких температурах и состояния D и N при высоких температурах разделены скачком энтропии и объема

как при ФП 1 рода. Структуры молекул белка, возникающие в результате тепловой и холодной денатурации, различаются по конформации, гидратации и объему [Adrover et al., 2012]. На рис. 3 они обозначены как D и D*. Спинодали (внутренние эллипсы) и бинодали (внешние эллипсы) соприкасаются в критических точках, где $\Delta S_N^D = 0$. В таких точках при температурах T_3 и T_4 различие между нативными молекулами и интермедиатами исчезает, и фазы, ранее находившиеся в равновесии, становятся тождественными. Этими точками обозначены критические фазовые переходные состояния. Между ними располагается закритическая область ФД раствора белка [Rozhkov, Goryunov, 2014]. Этой области соответствуют состояния раствора макроскопически однородного, но имеющего пониженную термодинамическую устойчивость. При переходе в закритические состояния раствор вначале становится однородным и лишь затем утрачивает свойства двухфазной системы. Поэтому в таких системах могут быть обнаружены динамические кластеры белка, имеющего конформацию интермедиатов. Кластеры имеют размер около 100 нм и окружены мономерами белка в преимущественно нативном состоянии.

Непрерывные фазовые переходы

Белок в нативном состоянии N также может быть представлен двумя конформерами: N и N* [Nakamura et al., 2007; Bian et al., 2014]. Изменение мольной доли этих конформеров с температурой, вероятно, может быть описано как непрерывный фазовый переход и поэтому должно быть учтено на ФД (рис. 1). В области пересечения «нейтральных» линий $\Delta V_N^D = 0$, $\Delta S_N^D = 0$, и поэтому $\Delta S/\Delta V = 0/0$, что противоречит уравнению Клапейрона – Клаузиуса для ФП 1 рода. В таком случае новая фаза возникает не в результате микроскопических флуктуаций, а в результате изменения параметра порядка и симметрии системы [Базаров, 1991].

Заключение

Таким образом, использование ФД раствора глобулярного белка в координатах температура – энтропия {TS}, полученной путем анализа изобарических сечений ФД в координатах давление – температура {PT}, позволило показать сопряженность метастабильных и нестабильных состояний раствора с образованием в том же растворе интермедиатов сворачивания белка. Обосновано предположение о том, что интермедиаты группируются в отдельные

микрофазы, которые стабилизируются за счет капиллярного эффекта. Капиллярное давление балансирует химический потенциал интермедиатов так, что они могут находиться в метастабильном равновесии с молекулами денатурированного и нативного белка в процессе ФП 1 рода. При этом внешнее давление остается одинаковым для всех фаз. Такой подход позволяет также показать, что метастабильные фазовые равновесия нативный белок – интермедиат и денатурированный белок – интермедиат имеют признаки равновесия типа L–L в области как низких, так и повышенных температур, и объяснить их возникновение вдали от области ФП 1 рода. При переходе через линию критических состояний из области как низких, так и высоких температур в область промежуточных температур возникают мезофазные состояния раствора нативного белка. В этих состояниях раствор макроскопически однороден, но содержит динамические нанокластеры из интермедиатов белка. В дальнейшем использование трансформации ФД, в частности в координаты температура – плотность упаковки (структурная координата), может позволить отобразить полиморфные состояния белка в растворе и объяснить механизм их возникновения.

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

Литература

- Александров В. Я. Реактивность клеток и белки. Л.: Наука, 1985. 318 с.
- Базаров И. П. Термодинамика. М.: Высшая школа, 1991. 376 с.
- Линг Г. Физическая теория живой клетки: Незамеченная революция. СПб.: Наука, 2008. 376 с.
- Рожков С. П. Трехкомпонентная система вода-биополимер-ионы как модель молекулярных механизмов осмотического гомеостаза // Биофизика. 2001. Т. 46, № 1. С. 53–59.
- Рожков С. П., Горюнов А. С. Стабильные, метастабильные и закритическая фазы в растворах глобулярных белков между верхней и нижней температурами их денатурации // Биофизика. 2017. Т. 62, вып. 4. С. 665–673. doi: 10.1134/S0006350917040182
- Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. Физика белка. М.: КДУ, 2002. 376 с.
- Adrover M., Martorell G., Martin S. R., Urosev D., Konarev P. V., Svergun D. I., Daura X., Temussi P., Pastore A. The role of hydration in protein stability: comparison of the cold and heat unfolded states of Yfh1 // J. Mol. Biol. 2012. Vol. 417, no. 5. P. 413–424. doi: 10.1016/j.jmb.2012.02.00

Asherie N. Protein crystallization and phase diagrams // *Methods*. 2004. Vol. 34, no. 3. P. 266–272. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.028

Badasyan A., Mamasakhlisov Y. Sh., Podgornik R., Morozov V. Solvent effects in the helix-coil transition model can explain the unusual biophysics of intrinsically disordered proteins // *J. Chem. Phys.* 2015. Vol. 143, no. 1. P. 14–102. doi: 10.1063/1.492329

Bian L., Wua D., Hub W. Temperature-induced conformational transition of bovine serum albumin in neutral aqueous solution by reversed-phase liquid chromatography // *Biomed. Chromatogr.* 2014. Vol. 28, no. 2. P. 295–301. doi: 10.1002/bmc.3020

Bian L., Ji X. Distribution, transition and thermodynamic stability of protein conformations in the denaturant-induced unfolding of proteins // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 3. P. e91129. doi: 10.1371/journal.pone.0091129

Cacciuto A., Frenkel D. Stress inside critical nuclei // *J. Phys. Chem. B*. 2005. Vol. 109, no. 14. P. 6587–6594. doi: 10.1021/jp0456483

Dave K., Gruebele M. Fast-folding proteins under stress // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. Vol. 72, no. 22. P. 4273–4285. doi: 10.1007/s00018-015-2002-3

Dumetz A. C., Chockla A. M., Kaler E. W., Lenhoff A. M. Protein phase behavior in aqueous solutions: crystallization, liquid – liquid phase separation, gels, and aggregates // *Biophys. J.* 2008. Vol. 94, no. 2. P. 570–583. doi: 10.1529/biophysj.107.116152

Gebauer D., Kellermeier M., Gale J. D., Bergström L., Cölfen H. Pre-nucleation clusters as solute precursors in crystallisation // *Chem. Soc. Rev.* 2014. Vol. 43, no. 7. P. 2348–2371. doi: 10.1039/c3cs60451a

Gillespie C. M., Asthagiri D., Lenhoff A. M. Polymorphic protein crystal growth: influence of hydration and ions in glucose isomerase // *Cryst. Growth Des.* 2014. Vol. 14, no. 1. P. 46–57. doi: 10.1021/cg401063b

Grouazel S., Bonnete F., Astier J. P., Ferte N., Perez J., Veessler S. Exploring bovine pancreatic trypsin inhibitor phase transitions // *J. Phys. Chem. B*. 2006. Vol. 110, no. 39. P. 19664–19670. doi: 10.1021/jp0627123

Heremans K. Protein dynamics: Hydration and cavities. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2005. Vol. 38, no. 8. P. 1157–1165. doi: 10.1590/S0100-879X2005000800002

Hyman A. A., Weber C. A., Julicher F. Liquid-liquid phase separation in biology // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2014. Vol. 30, no. 1. P. 39–58. doi: 10.1146/annurev-cell-bio-100913-013325

Johari G. P. The Tammann phase boundary, exothermic disordering and the entropy contribution change on phase transformation // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2001. Vol. 3, no. 12. P. 2483–2487. doi: 10.1039/B100246P

Lomakin A., Asherie N., Benedek G. B. Aeolotopic interactions of globular proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96, no. 17. P. 9465–9468.

Matveev V. V. Protoreaction of protoplasm // *Cell Mol. Biol.* 2005. Vol. 51, no. 8. P. 715–723.

Meersman F., Smeller L., Heremans K. Protein stability and dynamics in the pressure – temperature plane // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. Vol. 1764, no. 3. P. 346–354. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.11.019

Miti T., Mulaj M., Schmidt J. D., Muschol M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases // *Biomacromolecules*. 2015. Vol. 16, no. 1. P. 326–335. doi: 10.1021/bm501521r

Nakamura S., Baba T., Kidokoro S. A molten globule-like intermediate state detected in the thermal transition of cytochrome c under low salt concentration // *Biophysical Chem.* 2007. Vol. 127, no. 1–2. P. 103–112. doi: 10.1016/j.bpc.2007.01.002

Rozhkov S. P. Phase transitions and precrystallization processes in a water-protein-electrolyte system // *J. Cryst. Growth*. 2004. Vol. 273, no. 1–2. P. 266–279. doi: 10.1016/j.jcrysgro.2004.08.021

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Dynamic protein clusterization in supercritical region of the phase diagram of water-protein-salt solutions // *J. Supercrit. Fluids*. 2014. Vol. 95. P. 68–74. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.028

Shin Y., Brangwynne C. P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease // *Science*. 2017. Vol. 357, no. 6357. P. 1253. doi: 10.1126/science.aaf4382

Vekilov P. G. Phase diagrams and kinetics of phase transitions in protein solutions // *J. Phys. Condens. Matter*. 2012. Vol. 24, no. 19. P. 193101. doi: 10.1088/0953-8984/24/19/193101

Vorontsova M. A., Maes D., Vekilov P. G. Recent advances in the understanding of two-step nucleation of protein crystals // *Faraday Discussion*. 2015. Vol. 179. P. 27–40. doi: 10.1039/c4fd00217b

Wang Y., Annunziata O. Comparison between protein-polyethylene glycol (PEG) interactions and the effect of PEG on protein-protein interactions using the liquid-liquid phase transition // *J. Phys. Chem. B*. 2007. Vol. 111, no. 5. P. 1222–1230. doi: 10.1021/jp065608u

Yaminsky I. V., Gvozdev N. V., Sil'nikova M. I., Rashkovich L. N. Atomic force microscopy study of lysozyme crystallization // *Crystallography Reports*. 2002. Vol. 47, no. 1. P. 149–158. doi: 10.1134/1.1529969

Yewdall N. A., Mason A. F., van Hest J. C. M. The hallmarks of living systems: towards creating artificial cells // *Interface Focus*. 2018. Vol. 8, no. 5. P. 20180023. doi: 10.1098/rsfs.2018.0023

Поступила в редакцию 20.03.2019

References

Aleksandrov V. Ya. Reaktivnost' kletok i belki [Cell reactivity and proteins]. Leningrad: Nauka, 1985. 318 p.

Bazarov I. P. Termodinamika [Thermodynamics]. Moscow: Vysshaya shkola, 1991. 376 p.

Finkelstein A. V., Ptitsyn O. B. Protein physics. N. Y.: Academic Press, 2002. 354 p. doi: 10.1002/cbf.1064

Ling N. G. Life at the cell and below-cell level: The hidden history of a fundamental revolution in biology. N. Y.: Pacific Press, 2001. 373 p.

Rozhkov S. P. Trekhkomponentnaya sistema voda-biopolimer-iony kak model' molekulyarnykh mekhanizmov osmoticheskogo gomeostaza [Three-component system water-biopolymer-ions as a model for

the molecular mechanisms of osmotic homeostasis]. *Biofizika* [Biophysics]. 2001. Vol. 46, no. 1. P. 53–59.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Stabil'nye, metastabil'nye i zakriticheskaya fazy v rastvorakh globulyarnykh belkov mezhdru verkhnei i nizhnei temperaturami ikh denaturatsii [Stable, metastable, and supercritical phases in solutions of globular proteins between upper and lower denaturation temperatures]. *Biofizika* [Biophysics]. 2017. Vol. 62, no. 4. P. 665–673. doi: 10.1134/S0006350917040182

Adrover M., Martorell G., Martin S. R., Urosev D., Konarev P. V., Svergun D. I., Daura X., Temussi P., Pastore A. The role of hydration in protein stability: comparison of the cold and heat unfolded states of Yfh1. *J. Mol. Biol.* 2012. Vol. 417, no. 5. P. 413–424. doi: 10.1016/j.jmb.2012.02.002

Asherie N. Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*. 2004. Vol. 34, no. 3. P. 266–272. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.028

Badasyan A., Mamasakhlisov Y. Sh., Podgornik R., Morozov V. Solvent effects in the helix-coil transition model can explain the unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. *J. Chem. Phys.* 2015. Vol. 143, no. 1. P. 14–102. doi: 10.1063/1.4923292

Bian L, Wua D., Hub W. Temperature-induced conformational transition of bovine serum albumin in neutral aqueous solution by reversed-phase liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 2014. Vol. 28, no. 2. P. 295–301. doi: 10.1002/bmc.3020

Bian L., Ji X. Distribution, transition and thermodynamic stability of protein conformations in the denaturant-induced unfolding of proteins. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 3. P. e91129. doi: 10.1371/journal.pone.0091129

Cacciuto A., Frenkel D. Stress inside critical nuclei. *J. Phys. Chem. B*. 2005. Vol. 109, no. 14. P. 6587–6594. doi: 10.1021/jp0456483

Dave K., Grubele M. Fast-folding proteins under stress. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. Vol. 72, no. 22. P. 4273–4285. doi: 10.1007/s00018-015-2002-3

Dumetz A. C., Chockla A. M., Kaler E. W., Lenhoff A. M. Protein phase behavior in aqueous solutions: crystallization, liquid – liquid phase separation, gels, and aggregates. *Biophys. J.* 2008. Vol. 94, no. 2. P. 570–583. doi: 10.1529/biophysj.107.116152

Gebauer D., Kellermeier M., Gale J. D., Bergström L., Cölfen H. Pre-nucleation clusters as solute precursors in crystallization. *Chem. Soc. Rev.* 2014. Vol. 43, no. 7. P. 2348–2371. doi: 10.1039/c3cs60451a

Gillespie C. M., Asthagiri D., Lenhoff A. M. Polymorphic protein crystal growth: influence of hydration and ions in glucose isomerase. *Cryst. Growth Des.* 2014. Vol. 14, no. 1. P. 46–57. doi: 10.1021/cg401063b

Grouazel S., Bonnete F., Astier J. P., Ferte N., Perez J., Veessler S. Exploring bovine pancreatic trypsin inhibitor phase transitions. *J. Phys. Chem. B*. 2006. Vol. 110, no. 39. P. 19664–19670. doi: 10.1021/jp0627123

Heremans K. Protein dynamics: Hydration and cavities. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2005. Vol. 38, no. 8. P. 1157–1165. doi: 10.1590/S0100-879X2005000800002

Hyman A. A., Weber C. A., Julicher F. Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*

2014. Vol. 30, no. 1. P. 39–58. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013325

Johari G. P. The Tammann phase boundary, exothermic disordering and the entropy contribution change on phase transformation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2001. Vol. 3, no. 12. P. 2483–2487. doi: 10.1039/B100246P

Lomakin A., Asherie N., Benedek G. B. Aeolotopic interactions of globular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96, no. 17. P. 9465–9468.

Matveev V. V. Protoreaction of protoplasm. *Cell Mol. Biology*. 2005. Vol. 51, no. 8. P. 715–723.

Meersman F., Smeller L., Heremans K. Protein stability and dynamics in the pressure – temperature plane. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. Vol. 1764, no. 3. P. 346–354. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.11.019

Miti T., Mulaj M., Schmidt J. D., Muschol M. Stable, metastable, and kinetically trapped amyloid aggregate phases. *Biomacromolecules*. 2015. Vol. 16, no. 1. P. 326–335. doi: 10.1021/bm501521r

Nakamura S., Baba T., Kidokoro S. A molten globule-like intermediate state detected in the thermal transition of cytochrome c under low salt concentration. *Biophysical Chem.* 2007. Vol. 127, no. 1–2. P. 103–112. doi: 10.1016/j.bpc.2007.01.002

Rozhkov S. P. Phase transitions and precrystallization processes in a water-protein-electrolyte system. *J. Cryst. Growth*. 2004. Vol. 273, no. 1–2. P. 266–279. doi: 10.1016/j.jcrysgro.2004.08.021

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Dynamic protein clusterization in supercritical region of the phase diagram of water-protein-salt solutions. *J. Supercrit. Fluids*. 2014. Vol. 95. P. 68–74. doi: 10.1016/j.supflu.2014.07.028

Shin Y., Brangwynne C. P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*. 2017. Vol. 357, no. 6357. P. 1253. doi: 10.1126/science.aaf4382

Vekilov P. G. Phase diagrams and kinetics of phase transitions in protein solutions. *J. Phys. Condens. Matter*. 2012. Vol. 24, no. 19. P. 193101. doi: 10.1088/0953-8984/24/19/193101

Vorontsova M. A., Maes D., Vekilov P. G. Recent advances in the understanding of two-step nucleation of protein crystals. *Faraday Discussion*. 2015. Vol. 179. P. 27–40. doi: 10.1039/c4fd00217b

Wang Y., Annunziata O. Comparison between protein-polyethylene glycol (PEG) interactions and the effect of PEG on protein-protein interactions using the liquid-liquid phase transition. *J. Phys. Chem. B*. 2007. Vol. 111, no. 5. P. 1222–1230. doi: 10.1021/jp065608u

Yaminsky I. V., Gvozdev N. V., Sil'nikova M. I., Rashkovich L. N. Atomic force microscopy study of lysozyme crystallization. *Crystallography Reports*. 2002. Vol. 47, no. 1. P. 149–158. doi: 10.1134/1.1529969

Yewdall N. A., Mason A. F., van Hest J. C. M. The hallmarks of living systems: towards creating artificial cells. *Interface Focus*. 2018. Vol. 8, no. 5. P. 20180023. doi: 10.1098/rsfs.2018.0023

Received March 20, 2019

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, Sergei

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

Goryunov, Andrei

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.115.32:582.632.1

ФРАКЦИОННЫЙ И ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ СУММАРНЫХ ЛИПИДОВ ПОЧЕК РАСТЕНИЙ РОДА *BETULA* L. В ПЕРИОД РАСПУСКАНИЯ

Н. П. Чернобровкина¹, И. В. Морозова², М. К. Ильинова¹

¹ Институт леса КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

² Институт водных проблем Севера КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

Проведено выделение из распускающихся почек растений рода *Betula* L. смесью хлороформа и метанола органических соединений, принятых за суммарные липиды (СЛ), и последовательными растворителями хлороформом, ацетоном и метанолом – органических соединений, принятых соответственно за нейтральные липиды (НЛ), гликолипиды (ГЛ) и фосфолипиды (ФЛ). Показано, что содержание СЛ в процессе распускания почек деревьев с морфологическими признаками березы пушистой *Betula pubescens* Ehrh., березы повислой *Betula pendula* Roth и карельской березы *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti варьировало в диапазоне 27–45 % от абсолютно сухой массы (а. с. м.). СЛ были представлены в основном фракцией НЛ – до 42 % от а. с. м., фракции ГЛ и ФЛ не превышали 13 и 8 % соответственно. Ненасыщенные жирные кислоты (ЖК) в почках берез составляли до 85 % от суммы ЖК. Основную долю их представляли линолевая и линоленовая кислоты (до 44 и 39 % от суммы ЖК соответственно), из насыщенных – пальмитиновая (до 32 %). Содержание линолевой кислоты снижалось в процессе распускания почек. Выявлены особенности липидного состава распускающихся почек берез, различающихся по морфологическим признакам.

Ключевые слова: *Betula pubescens* Ehrh.; *Betula pendula* Roth; *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti; почки; фазы распускания; суммарные; нейтральные; фосфо- и гликолипиды; жирные кислоты.

N. P. Chernobrovkina, I. V. Morozova, M. K. Ilyinova. THE COMPOSITION OF TOTAL LIPID FRACTIONS AND FATTY ACIDS IN BUDS OF BIRCH SPECIES DURING BUD BREAK

In the process of bud break in downy birch *Betula pubescens* Ehrh., silver birch *Betula pendula* Roth, and Karelian birch *Betula pendula* var. *carelica* Merckl., total lipid (TL) content in buds varied within 27–45 % of absolute dry weight (a. d. w.). The chief TL fraction

was neutral lipids, contributing up to 42 % of a. d. w., whereas glyco- and phospholipids did not exceed 13 and 8 %, respectively. Unsaturated FA in birch buds contributed up to 85 % to total FA. They were primarily represented by linoleic and linolenic acids (up to 44 and 39 % of total FA, respectively). The most abundant saturated FA was palmitic acid (up to 32 %). Linoleic acid content declined further into the bud break period. Species-specific features of the lipid composition of breaking buds in the birches were identified.

Key words: *Betula pubescens* Ehrh.; *Betula pendula* Roth; *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti; buds; bud break phases; total; neutral; phospho- and glycolipids; fatty acids.

Введение

К настоящему времени опубликовано значительное количество работ, посвященных изучению сезонных изменений фракционного и жирнокислотного состава (ЖКС) липидов разных органов берез [Чернобровкина, Ильинова, 1983; Родионов и др., 1987; Ветчинникова и др., 2000; Шуляковская и др., 2004; Ветчинникова, 2004, 2005]. Большое внимание уделено изучению липидного состава почек растений: обнаружены различия в качественном составе липидов и их содержании в почках растений рода *Betula* L. с морфологическими признаками, характерными для разных видов и форм березы, проведены исследования эндогенной, возрастной, сезонной, географической изменчивости разных представителей рода *Betula* L., исследован ЖКС и определены преобладающие жирные кислоты (ЖК) липидов почек берез. При изучении сезонной динамики содержания липидов в почках березы пушистой, повислой и карельской березы было показано, что максимум накопления липидов приходится на осенне-зимний период [Ветчинникова, 2004]. Весной количество липидов в почках снижается в связи с использованием их на ростовые процессы [Родионов и др., 1987]. Изменения фракционного и ЖКС липидов, происходящие в почках растений рода *Betula* L. по фазам их развития при переходе растений из состояния вынужденного покоя в вегетационный период, остаются неисследованными.

Целью нашей работы было изучение фракционного и ЖКС суммарных липидов почек растений рода *Betula* L. по фазам распускания.

Материалы и методы

Исследовали вегетативные почки 30-летних растений рода *Betula* L. с характерными морфологическими признаками березы пушистой *Betula pubescens* Ehrh. (далее – береза пушистая), березы повислой *Betula pendula* Roth

(береза повислая) и карельской березы *Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti (карельская береза), произрастающих на опытных участках Агробиологической станции Карельского научного центра РАН в окрестностях города Петрозаводска. Для проведения эксперимента осуществили идентификацию исследуемых берез по морфологическим признакам, по которым отнесли исследуемые растения к двум видам и подвиду [Ермаков, 1986; Ветчинникова, 2004]. Береза повислая характеризовалась прямым стройным стволом, высотой 13–15 м, диаметром 21–25 см на расстоянии 1 м от земли, имела ажурную крону и свисающие вниз ветви, однолетние побеги были красновато-бурые со смолистыми желёзками – «бородавками», поверхность листа матовая. Береза пушистая характеризовалась также прямым стройным стволом, высотой 10–12 м и диаметром 17–21 см, имела плотную крону с распростертыми вверх ветвями, ауксисласты были красновато-бурого цвета, покрытые густым опушением, листья также характеризовались ярко выраженным опушением. Карельская береза была прямоствольной, высотой 5–7 м, с диаметром ствола 11–14 см, на стволе отмечалось наличие характерных вздутий, неровностей и бугорчатых выпуклостей, выявлена высокая степень узорчатости текстуры древесины. Для исследований использовали по три растения с типичными для двух видов и подвида морфологическими признаками.

Исследования проводили с 29 апреля по 20 мая 2008 г. Почки со всех исследованных берез отбирали одновременно в утренние часы (10–11 ч) с боковых побегов средней части кроны южной экспозиции в соответствии с фенофазами распускания почек: I фаза – набухание почек (почки заметно увеличились в размерах, конец апреля), II фаза – разverzание почек (в верхней части почек появился конус молодых листьев, начало мая); III фаза – раскрытие вегетативных почек (молодые листья сложены в трубочку, вторая декада мая); IV фаза – мо-

лодые листья размером до 10 мм (обособление молодых листьев, поверхность листьев складчатая, видны черешки, третья декада мая) [Березовые..., 1992]. Фазы распускания почек у исследуемых растений прослеживали визуально, в год проведения эксперимента по срокам они совпадали.

Экстракцию из тканей суммарных липидов (СЛ) и их очистку проводили по общепринятым методам [Folch et al., 1957; Кейтс, 1975]. Извлекали СЛ системой растворителей – хлороформ : метанол (2:1 по объему). Разделение липидов на фракции выполняли методом колонной хроматографии, где в качестве неподвижной фазы использовали силикагель Davisil Silica gel (mesh) 100–200, а в качестве подвижной фазы – систему последовательных растворителей: хлороформ, ацетон, метанол соответственно для экстракции нейтральных липидов (НЛ), гликолипидов (ГЛ) и фосфолипидов (ФЛ). Процедура экстракции по J. Folch с соавторами [1957] системой растворителей хлороформ : метанол приводит к количественному извлечению в практически неизменном виде клеточных липидов, к которым относится огромное число органических соединений: углеводороды, спирты, альдегиды, кетоны и хиноны, нормальные насыщенные кислоты, воски, эфиры стериннов и спиртов, витаминов А, D, Е, простые эфиры глицерина, фосфолипиды, гликолипиды. Дальнейшее разделение липидной смеси элюентами с разной степенью полярности приводит к делению СЛ на следующие фракции: НЛ (неполярные компоненты) – углеводороды, каротиноиды и хлорофилл, воски, ЖК, альдегиды, кетоны; ГЛ (слабополярные компоненты) – моно- и дигалактозилдиглицериды, цереброзиды, гликозиды стериннов, сульфоллипиды кардиолипина и фосфатидовой кислоты, следовые количества НЛ; ФЛ (сильнополярные компоненты) представляют собой ФЛ и следы ГЛ [Кейтс, 1975]. Поэтому представленное в нашей работе обозначение фракций базировалось на общепринятой методике и обосновывалось преобладанием в них определенных фракций липидов. Объем растворителя, необходимый для полного извлечения каждой фракции, контролировали методом сжигания липидов в концентрированной серной кислоте при 200 °С (в электрическом блоке 15 минут) с последующим спектрофотометрированием растворов при 375 нм [Marsh, Weinstein, 1966]. Стандартным весовым методом определяли массу СЛ и их фракций в % от абсолютно сухой массы почек.

Жирные кислоты (ЖК) СЛ исследовали в виде метиловых эфиров, которые получа-

ли переэтерификацией липидов метанолом в присутствии ацетилхлорида. Разделение смеси ЖК на составляющие компоненты осуществляли на газожидкостном хроматографе «Хроматэк-Кристалл 5000.1» (Йошкар-Ола, Россия) с использованием капиллярной колонки Zebron ZB-FFAP (50 м × 0,32 мм). Анализ проводили в изотермическом режиме: температура колонки 190 °С, испарителя – 240 °С, детектора пламенно-ионизационного – 260 °С. Газ-носитель – азот. Скорость пропускания через колонку азота, водорода, воздуха – 50, 40, 400 мл/мин соответственно. Идентифицировали ЖК с помощью метчиков – стандартных ЖК (Supelko, 37 компонентов, USA), а также сопоставлением эквивалентной длины цепи с табличными данными [Jamieson, 1975]. Концентрацию ЖК рассчитывали методом процентной нормализации по площадям пиков [Столяров и др., 1978]. ЖК были выделены в группы, отличающиеся по числу двойных связей в углеродной цепи: ненасыщенные (моно-, ди- и триеновые) (ННЖК) и насыщенные (без двойных связей) (НЖК). Индекс двойных связей (ИДС), характеризующий степень ненасыщенности ЖК, рассчитывали по методу Лайонса и др. [Lyons et al., 1964]. Для сравнительного анализа липидов почек у разных берез были использованы ЖК: пальмитиновая C_{16:0}, стеариновая C_{18:0}, олеиновая C_{18:1}, линолевая C_{18:2}, линоленовая C_{18:3}.

Математическую обработку данных проводили с помощью общепринятых методов статистики с использованием пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены в виде средних арифметических значений трех и более независимых экспериментов и их стандартных ошибок, которые не превышали 10 %.

Результаты и обсуждение

Динамика СЛ и их фракций у распускающихся почек растений рода Betula L.

В распускающихся почках исследованных берез количество СЛ составляло 27–45 % от абсолютно сухой массы (а. с. м.) (рис. 1). Высокое содержание СЛ в почках берез связано с тем, что, как отмечено выше, процедура экстракции по J. Folch с соавт. [1957] системой растворителей хлороформ : метанол приводит к количественному извлечению клеточных липидов, к которым относится большое число органических соединений. Основная масса СЛ была представлена фракцией нейтральных липидов (НЛ) – до 42 % от а. с. м. (рис. 2). НЛ –

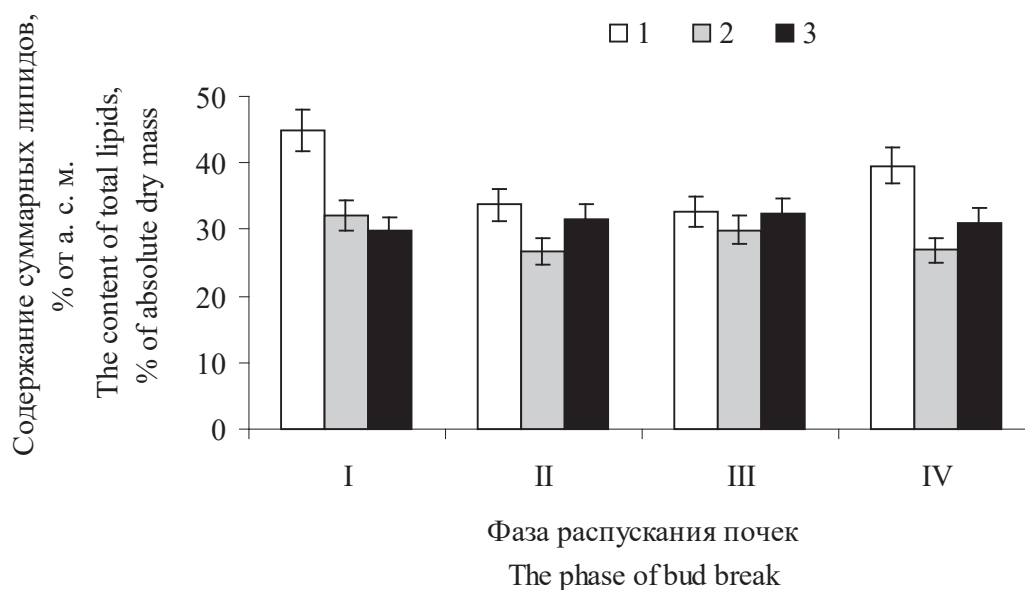


Рис. 1. Содержание суммарных липидов в почках растений рода *Betula* L. в период распускания. Здесь и на рис. 2:

1 – *Betula pubescens* Ehrh., 2 – *B. pendula* Roth, 3 – *B. pendula* var. *carelica* Merckl.

Fig. 1. Total lipid content in buds of birch of different species and forms during bud break. Here and in Fig. 2:

1 – *Betula pubescens* Ehrh., 2 – *B. pendula* Roth, 3 – *B. pendula* var. *carelica* Merckl.

это эфиры глицерина и ЖК, они служат формой хранения углерода в растениях и используются в основном как источник энергии и запасных соединений для роста побегов и листьев [Родионов и др., 1987; Piispanen, Saranpää, 2004; Нестеров, 2007; Марковская, Шмакова, 2017]. Снижение уровня НЛ в почках берез на первых этапах распускания может быть обусловлено особенно интенсивным использованием их на ростовые процессы, когда еще не происходит в достаточном количестве пополнения энергетического материала в клетках растений за счет фотосинтеза и поступления элементов питания из почвы.

Фракции глико- и фосфолипидов (ГЛ и ФЛ) не превышали 13 и 8 % от а. с. м. соответственно. Однонаправленного для всех берез изменения содержания ГЛ в процессе распускания почек не наблюдалось. ГЛ – сложные липиды, в составе которых имеются молекулы углеводной группы, являются основными компонентами тилакоидных мембран хлоропластов. ФЛ составляют основу всех мембран клетки. Уровень этой фракции липидов у трех берез повышался в фазу раскрытия почек. Очевидно, в этот период, в III фазу распускания почек, когда почки раскрываются и появляются молодые листья, ФЛ в них активно синтезируются и принимают участие в формировании клеточных структур. Ранее на основании сравнительного исследо-

вания липидного состава распускающихся почек (без учета фаз развития) и молодых листьев у березы повислой и березы пушистой было сделано заключение, что при распускании почек существенно повышается содержание ФЛ в связи с активным образованием клеточных структур, в мембраны которых они входят [Шуляковская и др., 2004]. Наши данные показали, что это происходит в III фазу распускания почек. Перед появлением хвои в меристемах почек хвойных растений содержание ГЛ и ФЛ в мембранах также значительно возрастало, что объясняют увеличением размеров клеток и формированием их фотосинтетического аппарата [Алаудинова, 2011].

Динамика ЖК СЛ у распускающихся почек растений рода Betula L.

В СЛ почек исследованных берез поддерживался высокий уровень ненасыщенных ЖК (ННЖК) – до 85 % от суммы ЖК, свидетельствующий о немалой степени жидкости мембран клеток развивающихся почек, что, очевидно, является необходимым условием для активно протекающих в этот период метаболических процессов и обеспечивает защитные функции растений от возможных неблагоприятных климатических условий в весенний период (табл.). Показатели индекса двойных связей

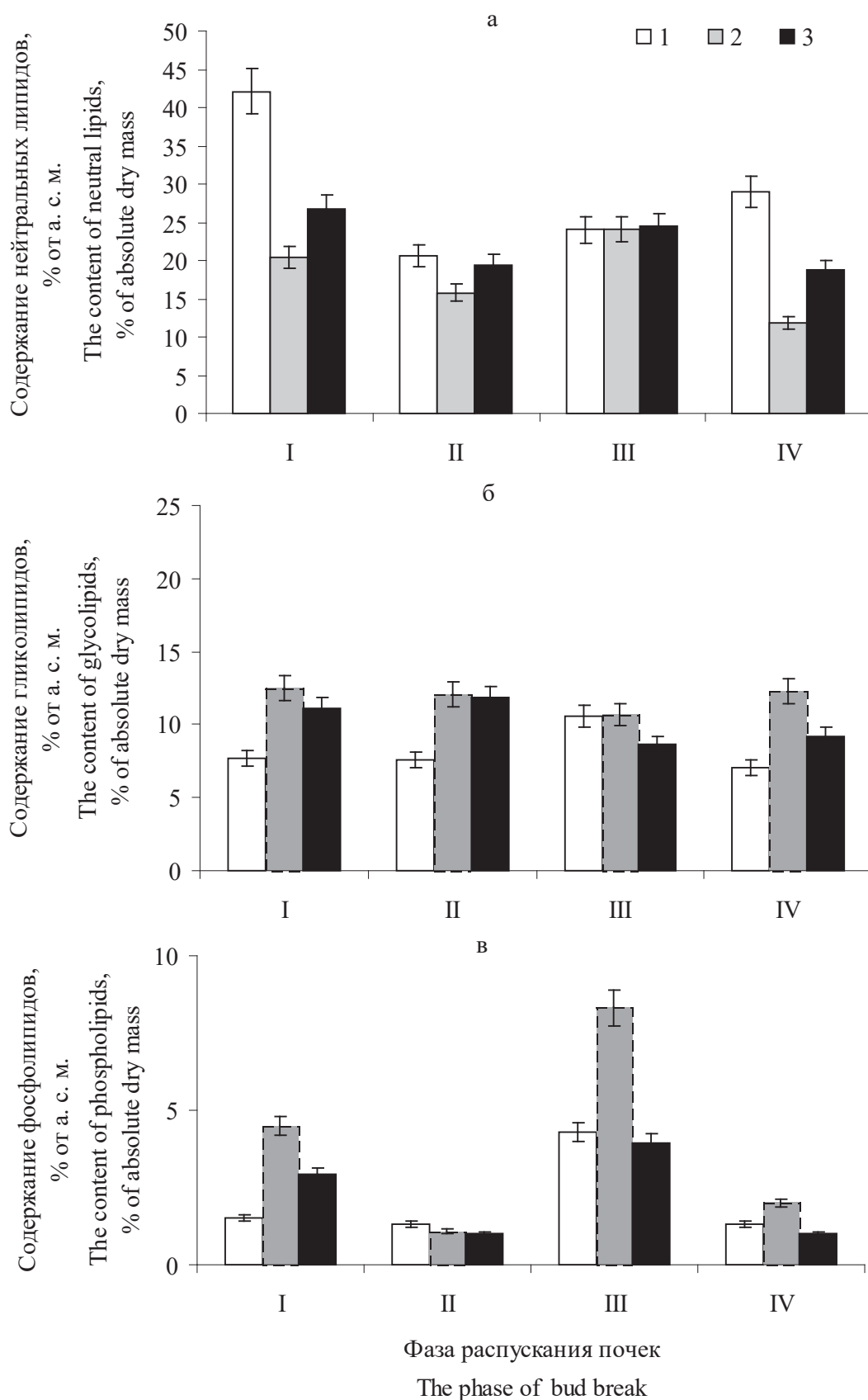


Рис. 2. Динамика содержания нейтральных липидов (а), глико- (б) и фосфолипидов (в) в почках растений рода *Betula* L. в период распускания

Fig. 2. Variation of the content of neutral lipids (a), glyco- (б) and phospholipids (в) in buds of birch of different species and forms during bud break

Состав жирных кислот (ЖК) суммарных липидов почек растений рода *Betula* L. по фазам распускания

The composition of total lipid fatty acids (FA) in buds of plants of the genus *Betula* L. at different phases of bud break

Фаза распускания Bud break phase	Содержание ЖК (% от суммы ЖК) Content of FA (% of the sum of FA)							
	16:0	18:0	18:1 (n-9)	18:2 (n-6)	18:3 (n-3)	Σ насыщ. Σ saturated	Σ ненасыщ. Σ unsaturated	ИДС DBI
<i>B. pubescens</i>								
I	29,34a	9,11a	4,64a	38,29в	18,62a	38,45a	61,55a	1,37a
II	32,40a	8,08a	3,24a	34,64	21,64a	40,48a	59,52a	1,37a
III	27,82в	4,81в	14,67a	30,99a	21,70a	32,63в	67,36в	1,41в
IV	30,61в	12,63a	7,07a	26,13в	23,56a	43,24a	56,76a	1,30a
<i>B. pendula</i>								
I	12,79	2,12	6,86	39,31в	38,91в	14,91	85,08	2,02
II	18,17	1,86	6,08в	35,03в	38,86в	20,03	79,97	1,92
III	29,54в	4,05в	10,4в	25,71в	30,30	33,59в	66,41в	1,52в
IV	27,28в	4,22в	9,52	28,43в	30,55	31,50в	68,50в	1,58в
<i>B. pendula var. carelica</i>								
I	13,68	2,17	6,88	44,34	32,94	15,85	84,16	1,94
II	18,49	2,25	9,91	40,60	28,76	20,74	79,27	1,77
III	17,70	2,90	7,53	38,74	33,14	20,60	79,41	1,84
IV	17,54	2,25	11,65	33,76	34,80	19,79	80,21	1,83

Примечание. а – различия достоверны по сравнению с показателями, характеризующими соответствующую фазу у двух других берез при $p \leq 0,05$; в – различия достоверны по сравнению с показателями, характеризующими соответствующую фазу у карельской березы при $p \leq 0,05$.

Note. а – differences are significant compared to the values describing the same phase in two other birch forms/species at $p \leq 0.05$; в – differences are significant compared to the values describing the same phase in Karelian birch at $p \leq 0.05$.

(ИДС) ЖК СЛ почек имели значения больше 1,0 у всех трех объектов, что говорит о высокой доле в составе СЛ ННЖК, содержащих в своем составе кратные связи. Значительная степень ненасыщенности ЖК мембранных липидов определяет физическое состояние биологических мембран, что важно для поддержания текучести липидного окружения мембранных белков и особенно ферментов, обеспечения пропускной способности мембран для ионов и молекул, а это, в свою очередь, определяет характер и интенсивность метаболизма в клетках [Somerville, Browse, 1991; Hugly, Somerville, 1992; Смирнов, Богдан, 2007; Лось, 2014]. В почках разных видов берез преобладали диеновые и триеновые кислоты, в листьях – триеновые [Ветчинникова и др., 2000; Шуляковская и др., 2004]. Предполагается, что при формировании листьев происходит десатурация ЖК с образованием новых двойных связей. Также при формировании фотосинтетического аппарата в клетках молодой хвои *Larix sibirica* Ledeb., *Picea obovata* Ledeb. и *Pinus sylvestris* L. в составе ННЖК ГЛ почти вдвое возрастала доля триеновых ЖК [Алаудинова, 2011]. Следует отметить, что максимальное содержание ННЖК в почках растений рода *Betula* и у хвойных растений отмечалось в зимний период, что обеспечивало поддержание жидкого фазового состояния мембран [Ветчинникова, 2004; Алау-

динова, 2011; Романова и др., 2016]. При переходе растений от зимнего к весеннему периоду повышалась скорость гидрогенизации двойных связей ННЖК и, как следствие, происходило снижение их доли в ЖКС липидов. Изменения в ЖКС листовых и хвойных древесных растений свидетельствуют о наличии у них определенной аналогии в перестройке клеточного метаболизма в сезонных циклах их развития.

Группу ННЖК почек исследованных берез в период распускания составляли преимущественно линолевая $C_{18:2}$ и линоленовая $C_{18:3}$ кислоты (до 44 и 39 % от суммы ЖК соответственно). Растения, в отличие от животных, могут синтезировать эти ЖК, которые в основном и определяют состояние мембран [Miquel, Browse, 1992; Macartney et al., 1994; Васьковский, 1997; Лось, 2001; Hills, Roscoe, 2006; Dörmann, 2006; Алаудинова, Миронов, 2011; Попов и др., 2017]. Уровень линоленовой кислоты в СЛ почек исследованных берез во все фазы распускания был высоким. Значительное количество этой кислоты в СЛ почек обеспечивало активные метаболические процессы, связанные со структурно-функциональными изменениями при переходе растения из состояния вынужденного покоя к активной вегетации. При росте листовой пластинки у березы повислой и березы пушистой происходило снижение относительного содержания линолевой кислоты ($C_{18:2}$) и повы-

шение линоленовой ($C_{18:3}$), что было наиболее выражено в ГЛ листьев [Шуляковская и др., 2004]. Увеличение степени ненасыщенности ЖК в процессе развития листа связывают с биогенезом хлоропластов, мембраны тилакоидов которых отличаются высоким уровнем ННЖК (до 85–90 % от суммы ЖК) [Murphy, 1986]. Триеновые ЖК обладают значительно более низкой по сравнению с насыщенными, моно- и диеновыми ЖК температурой плавления, что крайне важно для сохранения мембранами жидкокристаллического состояния, обеспечивающего активное протекание метаболических процессов в клетке. Преимущественное накопление линоленовой кислоты именно в тилакоидных мембранах хлоропластов обусловлено той важной ролью, которую играет данная ЖК в процессе фотосинтеза. Эта ЖК способна принимать спиральную конформацию, что позволяет включающим ее липидам образовывать комплексы с мембранными белками и пигментами при построении фотосинтетических субъединиц и обеспечивает возможность переноса электронов по электронтранспортной цепи хлоропластов [Laskay, 1986].

Обнаруженное нами в процессе распускания почек у исследованных берез снижение уровня линолевой кислоты, возможно, обусловлено использованием ее в метаболических процессах при переходе растения к активной вегетации. В СЛ листьев по сравнению с почками у березы повислой и березы пушистой наблюдалось повышенное содержание триеновых кислот (главным образом линоленовой) за счет пониженного уровня диеновых (преимущественно линолевой) [Ветчинникова и др., 2000], и, как отмечено выше, при росте листовой пластинки происходило снижение содержания линолевой кислоты [Шуляковская и др., 2004]. В весенний период динамика ННЖК в почках листовых древесных пород (судя по березе) и хвойных растений различается и у разных видов хвойных растений имеет характерные для вида особенности [Ветчинникова и др., 2000; Шуляковская и др., 2004; Алаудинова, 2011; Романова и др., 2016].

В почках исследованных берез в группе НЖК преобладала пальмитиновая (до 32 % от суммы ЖК). Ранее также было показано, что в почках и листьях березы повислой и пушистой эта кислота составляла максимальное количество среди НЖК [Чернобровкина, Ильинова, 1983; Родионов и др., 1987; Ветчинникова и др., 2000; Шуляковская и др., 2004]. В распускающихся почках исследованных берез однонаправленного изменения содержания пальмитиновой и стеариновой кислот не наблюдалось.

*Различия в липидном составе распускающихся почек у различающихся по морфологическим признакам растений рода *Betula* L.*

Значительные изменения уровня СЛ в распускающихся почках происходили только у березы пушистой. В фазу набухания почек уровень СЛ у нее в 1,4 раза превышал этот показатель у березы повислой, в 1,5 раза – у карельской березы и в 1,5 и 1,3 раза превышал уровень липидов в молодых листьях у березы повислой и карельской березы соответственно. Ранее также было показано, что у почек растений с морфологическими показателями березы пушистой по сравнению с березой повислой, идентифицированной по морфологическим признакам, высоко содержание СЛ, повышенный уровень короткоцепочковых и насыщенных ЖК [Ветчинникова и др., 2000; Ветчинникова, 2004]. В фазы разворачивания и особенно раскрытия почек уровень СЛ в них у трех берез был близким. У березы пушистой отмечалось самое высокое содержание НЛ в набухших почках и в молодых листьях. В фазу раскрытия почек уровень НЛ в их составе был одинаковым у всех берез (24 % от а. с. м.). Динамика НЛ в почках трех берез в первые три фазы распускания была идентичной, в IV фазу – в молодых листьях по сравнению с III фазой у березы пушистой содержание НЛ повышалось, а у других берез – снижалось.

В почках березы пушистой в процессе распускания отмечалось минимальное количество ГЛ, кроме фазы раскрытия, когда уровень ее повышался и достигал значения этого показателя у березы повислой (11 % от а. с. м.). В почках березы повислой уровень ГЛ не изменялся в период исследования, а у карельской березы содержание этой фракции понижалось к фазе раскрытия почек и оставалось на том же уровне в молодых листьях.

У березы повислой в набухающих почках, и особенно в фазу их раскрытия, содержание ФЛ было значительно выше (4–8 % от а. с. м.), чем у других берез, в то время как в фазу разворачивания и в молодых листьях уровни ФЛ у всех исследованных берез сближались. У березы пушистой уровень ФЛ в почках был неизменным (до 2 % от а. с. м.) в период исследования, за исключением фазы раскрытия почек, когда он повышался (до 4 % от а. с. м.). У березы повислой и карельской березы отмечалась идентичная динамика ФЛ в почках – снижение уровня во II и IV фазы при повышенном содержании в I и III фазы.

У березы пушистой, в отличие от других берез, отмечался самый низкий уровень ННЖК (57–67 % от суммы ЖК) во все фазы. В почках

березы повислой в последние две фазы распускания сумма данной группы ЖК снижалась, а в почках карельской березы в период исследования оставалась без изменений.

Самое низкое содержание линоленовой кислоты обнаружено у березы пушистой в набухших почках (19 % от суммы ЖК), в дальнейшем в процессе распускания почек отмечалась тенденция к увеличению уровня этой кислоты (до 24 %). В почках березы повислой уровень линоленовой кислоты в III и IV фазах был пониженным по сравнению с двумя первыми фазами, у карельской березы ее содержание оставалось стабильным в период исследования. Уровень линолевой кислоты был самый высокий в почках карельской березы по сравнению с другими березами.

Содержание пальмитиновой кислоты в почках березы пушистой в исследуемый период было стабильно высокое (28–32 % от суммы ЖК). Уровень ее значительно увеличивался в последние две фазы распускания почек березы повислой (в 2,3 раза) и оставался относительно стабильным у карельской березы (14–18 %). Уровень стеариновой кислоты в почках берез составлял лишь 2–13 %. Он был более высоким в почках березы пушистой по сравнению с другими березами, и лишь в фазе раскрытия почек содержание ее приближалось к уровню у других берез. У березы повислой уровень стеариновой кислоты повышался вдвое в две последние фазы. У карельской березы ее содержание было самым низким в последние две фазы распускания почек – вдвое ниже, чем у березы повислой, и в 5,6 раза ниже, чем у березы пушистой.

Заключение

В результате исследований у растений рода *Betula* L. выявлены тенденции, касающиеся изменения содержания СЛ, их фракций и ЖК СЛ в почках по фазам распускания. Содержание СЛ варьировало от 27 до 45 % от а. с. м. в зависимости от фазы распускания почек. В составе СЛ преобладали НЛ (до 42 % от а. с. м.), ГЛ и ФЛ не превышали 13 и 8 % соответственно. ННЖК составляли до 85 % от суммы ЖК. Преобладание ННЖК в СЛ почек берез позволяет сохранять текучесть мембран их тканей на физиологически активном уровне, обеспечивающем интенсивные структурно-функциональные изменения в распускающихся почках и устойчивость их к возможным неблагоприятным климатическим условиям в весенний период.

Основной вклад в группу ННЖК почек берез вносили линолевая и линоленовая (до 44

и 39 % от суммы ЖК соответственно), в группу НЖК – пальмитиновая (до 32 %). Установленное снижение содержания линолевой кислоты в почках берез в процессе их распускания, вероятно, связано с использованием этой кислоты в метаболических процессах, направленных на формирование структур молодого листа, при дальнейшем росте которого продолжается ее снижение и накапливаются триеновые кислоты, преимущественно линоленовая, активно участвующая в процессе фотосинтеза.

Особенности липидного состава распускающихся почек исследуемых берез, различающихся по морфологическим признакам, заключаются в следующем. У березы пушистой, в отличие от двух других берез, отмечался высокий уровень СЛ и фракции НЛ в набухших почках и молодых (до 10 мм) листьях; низкий уровень ГЛ и ФЛ, за исключением фазы раскрытия почек; высокое содержание НЖК (до 43 % от суммы) (кроме III фазы), обусловленное преимущественно высоким уровнем пальмитиновой и стеариновой кислот; низкий уровень линоленовой кислоты и олеиновой (кроме III фазы). У близкородственных растений – березы повислой и ее подвида карельской березы – показатели, характеризующие содержание исследуемых липидных соединений в распускающихся почках, составляли близкие величины. Отличительной особенностью карельской березы является значительно более низкий уровень ФЛ в фазе раскрытия почек по сравнению с другими березами, пальмитиновой и стеариновой кислот – в последние две фазы их распускания, а также стабильное содержание суммы ННЖК и повышенный уровень линолевой кислоты в период исследования.

Выявленные различия в содержании СЛ, их фракций и жирнокислотного состава у распускающихся почек различающихся по морфологическим показателям берез могут отражать особенности липидного обмена тканей в процессе развития почек в весенний период. Физиолого-биохимические механизмы, обуславливающие процессы аккумуляции липидных соединений в почках разных видов и форм растений рода *Betula* L. в годичном цикле их развития, в частности, по фазам распускания, являются во многом нераскрытыми и представляют интерес для дальнейших исследований.

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

ществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (Институт леса КарНЦ РАН).

Литература

Алаудинова Е. В. Экологические особенности низкотемпературной адаптации лесообразующих хвойных видов Сибири: структурно-химические изменения меристем почек: Дис. ... докт. биол. наук. Красноярск, 2011. 462 с.

Алаудинова Е. В., Миронов П. В. Сосна обыкновенная: особенности метаболизма мембранных липидов живых тканей почек // ИВУЗ. Лесной журнал. 2011. № 4. С. 17–23.

Березовые леса Беларуси: типы, ассоциации, сезонное развитие и продуктивность / Под ред. И. Д. Юркевича. Минск: Наука і тэхніка, 1992. 183 с.

Васьковский В. Е. Липиды // Соросовский образоват. журнал. 1997. № 3. С. 32–37.

Ветчинникова Л. В. Береза: вопросы изменчивости. М.: Наука, 2004. 183 с.

Ветчинникова Л. В. Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula* L. М.: Наука, 2005. 269 с.

Ветчинникова Л. В., Шуляковская Т. А., Канючкова Г. К. Жирнокислотный состав суммарных липидов различных органов *Betula pendula* Roth. и *B. pubescens* Ehrh., произрастающих в Карелии // Раст. ресурсы. 2000. Т. 36(2). С. 85–92.

Ермаков В. И. Механизмы адаптации березы к условиям Севера. Л.: Наука, 1986. 144 с.

Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 322 с.

Лось Д. А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биол. химии. 2001. Т. 41. С. 161–198.

Лось Д. А. Десатуразы жирных кислот. М.: Научный мир, 2014. 346 с.

Марковская Е. Ф., Шмакова Н. Ю. Растения и лишайники Западного Шпицбергена. Петрозаводск: ПетрГУ, 2017. 270 с.

Нестеров В. Н. Состав нейтральных липидов *Hidrilla verticillata* (L. FIL.) в условиях аккумуляции и элиминации ионов тяжелых металлов // Прикл. проблемы экологии. 2007. С. 1045–1054.

Попов В. Н., Антипина О. В., Пчелкин В. П., Цыденданбаев В. Д. Изменение жирнокислотного состава липидов хлоропластных мембран растений табака при низкотемпературном закаливании // Физиология растений. 2017. Т. 62, № 2. С. 109–115.

Родионов В. С., Ильинова М. К., Шуляковская Т. А. Годичные ритмы концентрации и жирнокислотного состава липидов почек березы // Лесоведение. 1987. № 4. С. 57–64.

Романова И. М., Живетьев М. А., Дударева Л. В., Граскова И. А. Динамика жирнокислотного состава и активности ацил-липидных десатураз в хвое *Pinus sylvestris* L., произрастающей в Иркутской области // Химия растит. сырья. 2016. № 2. С. 61–66.

Смирнов Л. П., Богдан В. В. Липиды в физиолого-биохимических адаптациях экотермных организ-

мов к абиотическим и биотическим факторам среды. М.: Наука, 2007. 182 с.

Столяров Б. В., Савинов И. М., Витенберг А. Г. Руководство к практическим работам по газовой хроматографии. Л.: Химия, 1978. 294 с.

Чернобровкина Н. П., Ильинова М. К. Состав жирных кислот глико- и фосфолипидов почек и листьев березы повислой // Липидный обмен древесных растений в условиях Севера. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1983. С. 112–118.

Шуляковская Т. А., Ветчинникова Л. В., Канючкова Г. К., Ильинова М. К. Содержание липидов и жирнокислотный состав их фракций в различные фазы развития почек и листьев *Betula pendula* Roth и *B. pubescens* Ehrh. // Раст. ресурсы. 2004. Т. 40(1). С. 69–75.

Dörmann P. Lipid synthesis, metabolism and transport. (Chapter 17) // Advances in photosynthesis and respiration. The structure and function of plastids / Ed. by R. R. Wise, J. K. Hooper. Dordrecht: Springer-Verlag, 2006. P. 335–353.

Folch J., Lees M., Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226, no. 1. P. 497–509.

Hills M. J., Roscoe T. J. Synthesis of Structural and Storage Lipids by the ER // Plant Cell Monographs. The Plant Endoplasmic Reticulum / Ed. by D. G. Robinson. 2006. Vol. 4. P. 155–186.

Hugly S., Somerville C. A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature // Plant Physiol. 1992. Vol. 99. P. 197–202.

Jamieson G. R. GLC identification techniques for long-chain unsaturated fatty acids // J. Chromat. Sci. 1975. Vol. 13. P. 491–497.

Laskay G., Lehoczki E. Correlation between linolenic acid deficiency in chloroplast membrane lipids and decreasing photosynthetic activity in barley // Biochim. Biophys. Acta. 1986. Vol. 849, no. 1. P. 77–84.

Lyons J. M., Wheaton T. A., Pratt H. K. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plant // Plant Physiology. 1964. Vol. 39, no. 2. P. 262–268.

Marsh J. B., Weinstein D. B. Simple charring method for determination of lipids // J. Lipids Res. 1966. Vol. 7, no. 4. P. 574–576.

Macartney A. I., Maresca B., Cossins A. R. Temperature adaptation of biological membranes / Ed. A. R. Cossins. London: Portland Press, 1994. P. 129–139.

Miquel M., Browse J. Arabidopsis Mutants Deficient in Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis. Biochemical and Genetic Characterization of a Plant Oleoyl-Phosphatidylcholine Desaturase // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. P. 1502–1509.

Murphy D. J. The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants // Biochim. Biophys. Acta. 1986. Vol. 864. P. 33–94.

Piispanen R., Saranpää P. Seasonal and within-stem variations of neutral lipids in silver birch (*Betula pendula*) wood Tree Physiology. 2004. No. 24. P. 991–999.

Somerville C., Browse J. Plant Lipids: Metabolism, Mutants and Membranes // Science. 1991. Vol. 252. P. 80–87.

Поступила в редакцию 21.02.2018

References

Alaudinova E. V. Ekologicheskie osobennosti nizko-temperaturnoi adaptatsii lesoobrazuyushchikh khvoinykh vidov Sibiri: strukturno-khimicheskie izmeneniya meristem pochek [Ecological patterns of low-temperature adaption in stand-forming coniferous species of Siberia: structural chemical changes of bud meristem]: Dsc (Dr. of Biol.) thesis. Krasnoyarsk, 2011. 462 p.

Alaudinova E. V., Mironov P. V. Sosna obyknovennaya: osobennosti metabolizma membrannykh lipidov zhivykh tkanei pochek [Scots pine: features of metabolism of membrane lipids of living bud tissues]. *IVUZ. Lesnoi zhurn.* [Bull. Higher Ed. Inst. Forestry J.]. 2011. No. 4. P. 17–23.

Berezovye lesa Belarusi: tipy, assotsiatsii, sezonnoe razvitie i produktivnost' [Birch forests of Belarus: types, associations, seasonal development and productivity]. Minsk: Navuka i tekhnika, 1992. 183 p.

Chernobrovkina N. P., Il'inova M. K. Sostav zhirnykh kislot gliko- i fosfolipidov pochek i list'ev berezy povislvi [The composition of fatty acids of glyco- and phospholipids in silver birch buds and leaves]. *Lipidnyi obmen drevesnykh rastenii v usloviyakh Severa* [Lipid metabolism in trees under boreal conditions]. Petrozavodsk: Karel. fil. AN SSSR, 1983. P. 112–118.

Ermakov V. I. Mekhanizmy adaptatsii berezy k usloviyam Severa [Mechanisms of birch adaptation to boreal conditions]. Leningrad: Nauka, 1986. 144 p.

Keits M. Tekhnika lipidologii [Lipidology techniques]. Moscow: Mir, 1975. 322 p.

Los' D. A. Struktura, regulyatsiya ekspressii i funktsionirovanie desaturaz zhirnykh kislot [Structure, regulation of expression and function of fatty acids desaturases]. *Uspekhi biol. khimii* [Biol. Chem. Reviews]. 2001. Vol. 41. P. 161–198.

Los' D. A. Desaturazy zhirnykh kislot [Fatty acid desaturases]. Moscow: Nauchnyi mir, 2014. 346 p.

Markovskaya E. F., Shmakova N. Yu. Rasteniya i lishainiki Zapadnogo Shpitsbergena [Plants and lichens of Western Spitsbergen]. Petrozavodsk: PetrGU, 2017. 270 p.

Nesterov V. N. Sostav neutral'nykh lipidov *Hidrilla verticillata* (L. FIL.) v usloviyakh akkumulyatsii i eliminatsii ionov tyazhelykh metallov [The composition of neutral lipids in *Hidrilla verticillata* (L. FIL.) under the accumulation and elimination of heavy metal ions]. *Prikl. probl. ekol.* [Appl. Iss. Ecol.]. 2007. P. 1045–1054.

Popov V. N., Antipina O. V., Pchelkin V. P., Tsyndenbaev V. D. Izmenenie zhirnokislотноgo sostava lipidov khloroplastnykh membran rastenii tabaka pri nizko-temperaturnom zakalivanii [Change in fatty acid composition of lipids of chloroplast membranes of tobacco plants during low-temperature hardening]. *Fiziol. rastenii* [Plant Physiol.]. 2017. Vol. 62, no. 2. P. 109–115.

Rodionov V. S., Il'inova M. K., Shulyakovskaya T. A. Godichnye ritmy kontsentratsii i zhirnokislотноgo sostava lipidov pochek berezy [Annual rhythms of concentration and fatty acid composition of lipids in birch buds]. *Lesovedenie* [Russ. J. Forest Sci.]. 1987. No. 4. P. 57–64.

Romanova I. M., Zhivet'ev M. A., Dudareva L. V., Graskova I. A. Dinamika zhirnokislотноgo sostava i aktivnosti atsil-lipidnykh desaturaz v khvoe *Pinus sylves-*

tris L., proizrastayushchei v Irkutskoi oblasti [Variation of the fatty acid composition and activity of acyl-lipid desaturases in the needles of *Pinus sylvestris* L. in Irkutsk Region]. *Khimiya rastit. syr'ya* [Chem. Plant Raw Material]. 2016. Vol. 2. P. 61–66.

Shulyakovskaya T. A., Vetchinnikova L. V., Kanyuchkova G. K., Il'inova M. K. Soderzhanie lipidov i zhirnokislотноyi sostav ikh fraktsii v razlichnye fazy razvitiya pochek i list'ev *Betula pendula* Roth i *B. pubescens* Ehrh. [The content of lipids and fatty acid composition of their fractions at different phases of bud and leaf development in *Betula pendula* Roth and *B. pubescens* Ehrh.]. *Rast. resursy* [Plant Res.]. 2004. Vol. 40(1). P. 69–75.

Smirnov L. P., Bogdan V. V. Lipidy v fiziologo-biokhimicheskikh adaptatsiyakh ektotermnykh organizmov k abioticheskim i bioticheskim faktoram sredy [Lipids in the physiological-biochemical adaptations of ectothermic organisms to abiotic and biotic environmental factors]. Moscow: Nauka, 2007. 182 p.

Stolyarov B. V., Savinov I. M., Vitenberg A. G. Rukovodstvo k prakticheskim rabotam po gazovoi khromatografii [Gas chromatography manual]. Leningrad: Khimiya, 1978. 294 p.

Vas'kovskii V. E. Lipidy [Lipids]. *Sorosovskii obrazovatel. zhurn.* [Soros Ed. J.]. 1997. No. 3. P. 32–37.

Vetchinnikova L. V. Bereza: voprosy izmenchivosti [Birch: issues of variability]. Moscow: Nauka, 2004. 183 p.

Vetchinnikova L. V. Karel'skaya bereza i drugie redkie predstaviteli roda *Betula* L. [Karelian birch and other rare representatives of the genus *Betula* L.]. Moscow: Nauka, 2005. 269 p.

Vetchinnikova L. V., Shulyakovskaya T. A., Kanyuchkova G. K. Zhirnokislотноyi sostav summarnykh lipidov razlichnykh organov *Betula pendula* Roth. i *B. pubescens* Ehrh., proizrastayushchikh v Karelii [Fatty acid composition of total lipids of various organs *Betula pendula* Roth. and *B. pubescens* Ehrh., growing in Karelia]. *Rast. resursy* [Plant Res.]. 2000. Vol. 36(2). P. 85–92.

Dörmann P. Lipid synthesis, metabolism and transport. (Chapter 17). *Advances in photosynthesis and respiration. The structure and function of plastids*. Dordrecht: Springer-Verlag, 2006. P. 335–353.

Folch J., Lees M., Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957. Vol. 226, no. 1. P. 497–509.

Hills M. J., Roscoe T. J. Synthesis of Structural and Storage Lipids by the ER. *Plant Cell Monographs. The Plant Endoplasmic Reticulum*. 2006. Vol. 4. P. 155–186.

Hugly S., Somerville C. A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. *Plant Physiol.* 1992. Vol. 99. P. 197–202.

Jamieson G. R. GLC identification techniques for long-chain unsaturated fatty acids. *J. Chromat. Sci.* 1975. Vol. 13. P. 491–497.

Laskay G., Lehoczki E. Correlation between linolenic acid deficiency in chloroplast membrane lipids and decreasing photosynthetic activity in barley. *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. Vol. 849, no. 1. P. 77–84.

Lyons J. M., Wheaton T. A., Pratt H. K. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plant. *Plant Physiology.* 1964. Vol. 39, no. 2. P. 262–268.

Marsh J. B., Weinstein D. B. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipids Res.* 1966. Vol. 7, no. 4. P. 574–576.

Macartney A. I., Maresca B., Cossins A. R. Temperature adaptation of biological membranes. London: Portland Press, 1994. P. 129–139.

Miquel M., Browse J. Arabidopsis Mutants Deficient in Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis. Biochemical and Genetic Characterization of a Plant Oleoyl-Phosphatidylcholine Desaturase. *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 1502–1509.

Murphy D. J. The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. Vol. 864. P. 33–94.

Piispanen R., Saranpää P. Seasonal and within-stem variations of neutral lipids in silver birch (*Betula pendula*) wood Tree Physiology. 2004. No. 24. P. 991–999.

Somerville C., Browse J. Plant Lipids: Metabolism, Mutants and Membranes. *Science.* 1991. Vol. 252. P. 80–87.

Received February 21, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Чернобровкина Надежда Петровна

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: chernobrovkina50@bk.ru

Морозова Ирина Валерьевна

младший научный сотрудник
Институт водных проблем Севера КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
пр. А. Невского, 50, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185030
эл. почта: ivm1502@yandex.ru

Ильинова Мария Казимировна

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: iljinova46@gmail.ru

CONTRIBUTORS:

Chernobrovkina, Nadezhda

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: chernobrovkina50@bk.ru

Morozova, Irina

Northern Water Problems Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
50 Al. Nevsky St., 185030 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: ivm1502@yandex.ru

Ilyinova, Maria

Forest Research Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: iljinova46@gmail.ru

УДК 574.52;577.152.34

АКТИВНОСТЬ Na^+/K^+ -АТФАЗЫ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ СТЕРЛЯДИ (*ACIPENSER RUTHENUS L.*) ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ФАКТОРОВ СРЕДЫ

Е. И. Кяйвярйнен, Н. Н. Немова

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

Исследования механизмов регуляции ионно-солевого и кислотно-щелочного равновесия в организме молоди стерляди особую актуальность приобретают в связи с возможной ее акклимацией к среде обитания с меняющейся соленостью и кислотностью. В аквариальных условиях были проведены две серии экспериментов по влиянию солености и pH среды на активность Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах сеголеток стерляди *Acipenser ruthenus L.* (средней массой ~ 50 граммов): в первой серии молодь стерляди выращивали в трех аквариумах с различной концентрацией соли – 0,3 (контроль), 3 и 6 ‰); во второй – молодь рыб содержалась в воде с концентрацией соли 0,3 ‰ и в трех аквариумах с различными значениями pH: 7,0; 8,0 и 9,0. В жабрах и мышцах рыб обнаружено достоверное ($p < 0,05$) увеличение активности Na^+/K^+ -АТФазы при возрастании солености среды до 6 ‰, а при повышении pH воды в аквариумах до 9,0 активность фермента достоверно ($p < 0,05$) снижалась. Показано, что одним из важных механизмов биохимической адаптации молоди стерляди, направленной на поддержание гомеостаза при акклимации к изменению солености и pH среды обитания, является активация/реактивация Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах рыб.

Ключевые слова: соленость; влияние pH; *Acipenser ruthenus L.*; Na^+/K^+ -АТФаза.

E. I. Kaivarainen, N. N. Nemova. Na^+/K^+ -ATPase ACTIVITY IN VARIOUS ORGANS OF THE STERLET (*ACIPENSER RUTHENUS L.*) UNDER CHANGES IN ENVIRONMENTAL FACTORS

Studies of the mechanisms regulating the ion-salt and acid-base balance in the organism of juvenile sterlet acquire special relevance in connection with its possible acclimation to habitats with varying salinity and acidity. In aquarium conditions, two series of experiments were carried out, investigating the effect of ambient salinity and pH on the activity of Na^+/K^+ -ATPase in the gills and muscles of juvenile sterlet, *Acipenser ruthenus L.* (average body mass ~ 50 g): in the first series juvenile sterlet were reared in three aquariums with different salt concentrations (control – 0.3, 3, 6 ‰); in the second series juvenile fish were kept in water with 0.3 ‰ salt concentration in three aquariums with different pH values: 7.0, 8.0, and 9.0. A significant ($p < 0.05$) increase in Na^+/K^+ -ATPase activity was observed in the gills and muscles of fish under salinity increase to 6 ‰, and when the water pH in the aquariums increased from 7.0 to 9.0, the activity of the enzyme declined significantly ($p < 0.05$). It is shown that activation / reactivation of Na^+/K^+ -ATPase in the gills and muscles of fish is one of the important mechanisms of biochemical adaptation in juvenile sterlet, aimed at maintaining homeostasis when acclimating to a change in ambient salinity and pH.

Key words: salinity; effect of pH; *Acipenser ruthenus L.*; Na^+/K^+ -ATPase.

Введение

Особенностью экологии эвригалинных видов рыб, к которым относится стерлядь *Acipenser ruthenus* L., является то, что на протяжении жизненного цикла они могут встречаться со значительными изменениями солености среды обитания. При этом успех адаптации зависит от способности рыб перестраивать свой водно-солевой обмен. При переходе из пресной воды в морскую эвригалинные рыбы переключаются с гиперосморегуляции плазмы крови (соленость < 9 ‰) на гипоосморегуляцию плазмы крови (соленость > 9 ‰).

Эколого-физиологические исследования разных видов осетровых показали высокую адаптивную пластичность, лежащую, по-видимому, в основе биологического прогресса представителей этого семейства [Кузьмичев, 2005]. Несмотря на то что стерлядь не образует проходные формы и представлена исключительно пресноводной формой, она выдерживает значения солености среды обитания до 10 ‰, тогда как для большинства представителей пресноводной ихтиофауны критическими являются значения выше 5–8 ‰ [Хлебович, 2012]. Известно, что изменение солености среды вызывает ответную реакцию у гидробионтов, в том числе у эвригалинных видов рыб, на уровне поведенческих и физиолого-биохимических механизмов [Бергер, 1986; Kültz, 2015].

Соленость среды тесно связана с водородным показателем (рН), который обусловлен не только растворенными минеральными [Алекин, 1970] и органическими веществами, но и содержанием CO₂ и жизнедеятельностью водных организмов [Скадовский, 1955]. На ряд физиологических и осморегуляторных процессов в пресноводных рыбах влияют изменения рН среды [Fenner, 2001], которые вызывают нарушения в кислотно-щелочной и ионной регуляции, причем щелочные значения способствуют аммиачной интоксикации [Wood, 1989; Wilkie et al., 1993; Wilkie, Wood, 1996]. Оптимальный диапазон рН отличается для различных видов рыб, при этом значения рН 6,5–9,0 оказываются наиболее благоприятными [Zweig, 1999; Neydarnejad, 2012]. Высокие (более 10,0) или низкие (менее 4,5) значения рН критичны для большинства водных организмов и могут приводить к уменьшению темпа их роста [Boyd, 1998; Zweig, 1999] и к смертности. Тем не менее обнаружены популяции иных рыб, в частности лосося Кларка (*Oncorhynchus clarki henshaw*), который обитает в сильнощелочных (рН 9,4) водах озера Пирамида (США, штат

Невада), и этот вид, по всей вероятности, уникально приспособлен к природным средам, которые были бы токсичны для других лососевых [Wilkie et al., 1993; Salama et al., 1999; Wilkie, 2002].

Устойчивость рыб к изменению солености и рН среды зависит не только от сформированности морфологических структур, ответственных за приспособление к этим факторам, но и от активности ферментов, входящих в их состав и участвующих в поддержании ионного гомеостаза. Вызванные изменением внешней среды сдвиги электролитного состава в организме, и прежде всего содержания ионов Na⁺ как наиболее варибельного компонента, приводят к адаптивным преобразованиям клеточного метаболизма [Хлебович, 2012]. Известно, что ключевая роль в процессах осмотической и ионной регуляции принадлежит АТФазам – белкам-ферментам активного транспорта, обеспечивающим перенос ионов против их концентрационного градиента [Болдырев и др., 2006]. Среди них фермент Na⁺/K⁺-АТФаза имеет особое значение, так как помимо непосредственной функции создания оптимального соотношения ионов Na⁺ и K⁺ в клетке он создает электрогенный градиент – движущую силу переноса других ионов в клетке. Этот мембранный фермент играет уникальную роль в клеточной функции, поскольку он обеспечивает создание ионных градиентов, активный перенос Na⁺ и K⁺ через клеточную мембрану и, таким образом, мембранный потенциал и осмотическое равновесие клетки. Имеется немало сведений о роли этого фермента в осморегуляции у таких рыб, как атлантический лосось *Salmo salar*, тихоокеанский лосось *Oncorhynchus*, тиляпия *Tilapia* [Folmar, Dickhoff, 1980; Kültz et al., 1992; Tipsmark et al., 2002; Fiol, Kültz, 2007]. Также было изучено воздействие солености и изменения рН среды [Shaughnessy et al., 2015] на примере эвригалинного вида – белого осетра (*Acipenser transontanus*), который оказался устойчив к широкому спектру солености и к кислотно-щелочным изменениям [Baker et al., 2009]. Акклимация обитающих в пресной воде осетровых рыб к изменению солености и рН включает ионно-осмотическую регуляцию путем изменения активности Na⁺/K⁺-АТФазы.

В нашей работе в качестве модельного объекта для исследований влияния абиотических факторов среды на ионно-осмотическую регуляцию использовали молодь стерляди *Acipenser ruthenus* L. Учитывая генетическую близость пресноводной стерляди *Acipenser ruthenus* L. к проходным осетровым, а также возможность

ее содержания и выращивания в прибрежных зонах эстуария, представляет интерес изучить в условиях аквариального эксперимента влияние возрастания солености до 6 ‰ и pH от 7 до 9 на активность осморегуляторного фермента Na^+/K^+ -АТФазы.

Материалы и методы

Проведение аквариального эксперимента

Эксперименты по влиянию солености и pH на активность Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах молоди стерляди (средней массой 50 г) проводили в аквариальной кафедре аквакультуры ФГОУ ВПО Калининградский государственный технический университет с использованием экспериментальных УЗВ (установки с замкнутым циклом водообеспечения). Кормление проводили 4 раза в сутки кормом Aller Futura. Дозу корма рассчитывали согласно кормовым таблицам для осетровых рыб – в зависимости от массы тела рыбы и температуры воды. Было проведено две серии экспериментов. В первой серии молодь стерляди выращивалась в трех аквариумах с различной концентрацией соли: I – 3 ‰; II – 6 ‰; III – контроль – 0,3 ‰. Для эксперимента использовали комплекс морской соли. Согласно литературным данным [Наточин и др., 1980], адаптация к повышенной солености у осетровых происходит через 12–15 суток, поэтому продолжительность эксперимента составляла 20 суток. В исследуемом временном и соленостном диапазоне смертность мальков не наблюдалась. В другой серии экспериментов молодь стерляди выдерживалась в трех аквариумах с концентрацией соли 0,3 ‰ и с различными значениями pH: I – 7,0; II – 8,0; III – 9,0. Следует отметить, что исследуемый диапазон кислотности среды (pH от 7,0 до 9,0) находится в пределах адаптивной нормы для стерляди, как и для большинства других видов рыб [Zweig, 1999].

Биохимические методы

В работе использованы химические реагенты, произведенные Sigma-Aldrich (США), приборы ЦКП КарНЦ РАН: гомогенизатор Tissue Lyser LT (Qiagen, Германия), центрифуга Allegra 64R (Beckman Coulter, США), термостатируемая водяная баня УТ-4334 (Россия), спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ-Спектр, Россия).

Определение активности Na^+/K^+ -АТФазы. Жаберные дужки у рыб извлекали после вылова особей, фильтровальной бумагой удаляли избыток воды. Хрящевую ткань

обрезали для получения жаберного эпителия. Кусочки мышечной и жаберной ткани получали от рыб через 5–7 мин после их отлова.

Активность Na^+/K^+ -АТФазы (КФ 3.6.1.3) определяли в супернатанте после гомогенизации и центрифугирования образцов жабр и мышц сеголеток стерляди, используя в качестве субстрата АТФ [Елаев, Семенов, 1974]. Пробы ткани 0,2 г гомогенизировали в 10-кратном объеме буфера для гомогенизации 0.1 М имидазола и 10^{-4} М EDTA, pH 7,5, и центрифугировали при 15 000 г в течение 30 минут. Осадок ресуспендировали в буфере для гомогенизации в соотношении 1:3 [г/мл] и добавляли 2% раствор дезоксихолата натрия до конечной концентрации 0,2 %. Приготовленный раствор выдерживали на холоде в течение 2 часов. Суспензию центрифугировали при 15 000 г в течение 30 минут. В полученном супернатанте оценивали активность Na^+/K^+ -АТФазы по разнице неорганического фосфата (Pi) в инкубационной среде (субстратный буфер) и среде без Na^+ и K^+ в присутствии ингибитора убаина (10^{-4} М). Полная инкубационная среда для определения активности фермента содержала 0,01 М NaCl, 0,02 М KCl, 0,002 М MgCl_2 , 3 мМ АТФ. В контроль добавляли убаин до конечной концентрации 10^{-3} , вместо субстратного буфера использовали буфер трис-HCl (pH = 7,55) без добавления солей. В результате гидролиза АТФ под действием АТФазы накапливается неорганический фосфат (Pi). Реакцию проводили при 37 °С в течение 30 мин и останавливали добавлением равного объема 10 % ТХУ. После центрифугирования (6000 г в течение 20 мин) в надосадочной жидкости определяли неорганический фосфат (Pi) [Kahovcova, ODavis, 1969]. Содержание Pi в пробе определяли по величине экстинкции по калибровочной кривой. Активность Na^+/K^+ -АТФазы оценивали по разности неорганического фосфата (Pi) полной среды и среды без Na^+ и K^+ в присутствии убаина за 1 час реакции в расчете на концентрацию белка.

Анализ содержания белка. Количественное содержание белка в исследуемом материале определяли согласно методу Бредфорда [Bradford, 1976]. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовался бычий сывороточный альбумин (БСА) в физиологическом растворе.

Статистическая обработка результатов

Цифровые данные были обработаны при помощи непараметрического критерия U (Вилкоксона – Манна – Уитни) [Гублер, Генкин,

Таблица 1. Активность Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах стерляди (*Acipenser ruthenus* L.) в средах с различной соленостью

Table 1. Na^+/K^+ -ATPase activity in gills and muscles of the sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) at different environmental salinity

Соленость Salinity	Органы Organs	Активность Na^+/K^+ -АТФазы (мкг Pi/на мг белка/час), $M \pm m$ Na^+/K^+ -ATPase activity ($\mu\text{g Pi}/\text{mg protein}/\text{h}$), $M \pm m$	Концентрация белка (мг/мл), $M \pm m$ Concentration of protein (mg/ml), $M \pm m$
Контроль 0,3 ‰ Control 0,3 ‰	Жабры Мышцы Gills Muscles	1,58 \pm 0,05 2,00 \pm 0,03	5,02 \pm 0,1 5,00 \pm 0,1
3 ‰	Жабры Мышцы Gills Muscles	1,95 \pm 0,05* 2,40 \pm 0,04*	6,95 \pm 0,08* 4,64 \pm 0,08*
6 ‰	Жабры Мышцы Gills Muscles	2,3 \pm 0,05* 2,8 \pm 0,06*	6,57 \pm 0,07* 3,60 \pm 0,10*

Примечание. *Статистически значимые различия показателей по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.

Note. *Significant differences of the parameters in comparison with the control, $p \leq 0,05$.

1969], использование которого позволяет оценивать достоверность различий при небольших размерах выборок ($n_1, n_2 \leq 20$). Критерий U позволил выявить различия между выборками с достоверностью $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Данные по определению активности Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах молоди стерляди, содержащейся в условиях различной солености, представлены в таблице 1.

Показано достоверное ($p < 0,05$) увеличение активности Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах при солености среды до 6‰, что указывает на участие фермента осморегуляции в поддержании водно-солевого баланса при возрастании солености среды (табл. 1). Увеличение активности Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах стерляди при достижении 6‰ солености среды согласуется с данными, полученными другими авторами [Tipsmark et al., 2002; Wilson et al., 2002; Shaughnessy et al., 2015].

Результаты исследований [Кузьмичев, 2005] по изучению ионного состава плазмы крови различных видов осетровых в среде с различной соленостью свидетельствовали о 100% выживаемости особей стерляди при акклимации к солености 6‰ при экспозиции в течение 15 суток. При экспозиции в среде с 10‰ соленостью наблюдалась гибель 50–53% мелкой молоди (до 7 г), а выживаемость рыб массой от 8 до 40 г составляла 100%. В воде с соленостью 15‰ все особи стерляди погибли через 24–28 часов. При повышении солености до 10‰ стер-

лядь переходила от гиперосмотического к гипоосмотическому типу регуляции, о чем свидетельствует поддержание концентрации ионов Na^+ в плазме крови на уровне, сходном со значением этого показателя у рыб в пресной воде. Высокая смертность наблюдалась у молоди белого осетра *Acipenser transmontanus* при экспозиции в среде с соленостью до 16‰ [Amiri et al., 2009] в возрасте 14 месяцев уже через 24 часа. Исходя из данных эксперимента по выживаемости можно предположить, что стерлядь устойчива к диапазону солености до 6‰.

Известно, что у рыб основную регуляторную функцию ионного обмена между организмом и внешней средой несут жабры, кишечник и почки [Матей, 1996; Виноградов, 2000; Kulac et al., 2013; Atli, Canli, 2013]. В нашей работе показано (табл. 1), что активность исследуемого фермента ионного транспорта у рыб, адаптированных к повышению солености до 6‰, достоверно выше по сравнению с контролем не только в жабрах, но и в мышцах. В скелетных мышцах рыб Na^+/K^+ -АТФаза также участвует в создании электрохимического градиента, но в отличие от органов, непосредственно связанных с осморегуляцией, определяет свойства возбуждения и сокращения мышечной ткани [Canfield et al., 2002; Doğanli et al., 2012] и сходным образом реагирует на изменение состава внешней среды обитания [Oseni, 2015].

В другой серии экспериментов молодь стерляди выдерживали в аквариумах с водой с различным рН, равным 7,0; 8,0 и 9,0. Таблица 2 иллюстрирует данные по активности Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах молоди стерляди.

Таблица 2. Активность Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах стерляди (*Acipenser ruthenus* L.) в средах с различным pH

Table 2. Na^+/K^+ -ATPase activity in gills and muscles of the sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) at different environmental pH

pH среды Environmental pH	Органы Organs	Активность Na^+/K^+ -АТФазы (мкг Pi/на мг белка/час), $M \pm m$ Na^+/K^+ -ATPase activity ($\mu\text{g Pi}/\text{mg protein}/\text{h}$), $M \pm m$	Концентрация белка (мг/мл) Concentration of protein (mg/ml)
pH 7,0	Жабры	1,69 ± 0,04	4,63 ± 0,08
	Мышцы Gills Muscles	2,21 ± 0,04	4,35 ± 0,05
pH 8,0	Жабры	1,46 ± 0,02*	4,45 ± 0,08
	Мышцы Gills muscles	1,60 ± 0,04*	4,26 ± 0,06
pH 9,0	Жабры	1,19 ± 0,03*	4,93 ± 0,08
	Мышцы Gills muscles	1,11 ± 0,04*	4,40 ± 0,10

Примечание. *Статистически значимые различия показателей по сравнению с pH = 7,0; $p \leq 0,05$.

Note. *Significant differences of the parameters in comparison with pH = 7,0; $p \leq 0,05$.

При повышении pH среды от 7,0 до 9,0 наблюдалось снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах стерляди (табл. 2), возможно, связанное либо со снижением секреции ионов H^+ , в которой косвенно принимает участие Na^+/K^+ -АТФаза за счет создания электрохимического градиента, либо с изменением проницаемости жаберного эпителия.

Поглощение Na^+ и Cl^- в жабрах пресноводных рыб осуществляется параллельно, но не связано друг с другом. Ионы H^+ и NH_4^+ и HCO_3^- обмениваются на Na^+ и Cl^- из внешней среды. При этом поглощение Na^+ сопряжено с секрецией H^+ с помощью Na^+/H^+ -транспортера, работающего за счет градиента ионов Na^+ , непосредственно создаваемого Na^+/K^+ -АТФазой. Поэтому при закислении окружающей среды многие исследования демонстрируют повышение активности и экспрессии этого транспортного белка при адаптации рыб к уменьшению pH [Choe et al., 2002; Hirata et al., 2003], а в щелочной среде с ростом pH активность Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и почках акклиматизированных рыб соответственно уменьшается, что связано с сокращением метаболизма на 40 % [Wang et al., 2003; Wood et al., 2007].

С другой стороны, при защелачивании увеличивается количество ионов HCO_3^- и регуляция внутриклеточного pH осуществляется путем обмена ионов бикарбоната на ионы Na^+ и Cl^- за счет $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ - и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -транспортеров [Матей, 1996; Виноградов, 2000; Choe et al., 2002; Hirata et al., 2003; Evans et al., 2005]. В результате на активный транспорт не требуется дополнительных энергетических затрат, так как осморегуляция осуществляется вместе с регуляцией кислот-

ности и секрецией продуктов обмена веществ [Виноградов, 2000]. Возможно, такая экономия энергии, затрачиваемой на осморегуляцию, может быть еще одним объяснением общей тенденции повышения ихтиомассы водоемов, отличающихся повышенными значениями pH от 6,5 до 9,0 [Китаев, 2007; Heydarnejad, 2012].

В связи с этим также интересно отметить эффект влияния уменьшения pH внешней среды на общий метаболизм рыб. Характерным проявлением такого воздействия является повышение проницаемости жаберного эпителия, что объясняется потерями ионов кальция, вовлеченных в регуляцию проницаемости [Виноградов, 2000; Моисеенко, 2003]. Можно предположить, что щелочная среда создает противоположный эффект и, напротив, способствует уменьшению проницаемости жабр. Такой механизм позволяет поддерживать осмотический гомеостаз, несмотря на низкие значения активного транспорта ионов через жаберный эпителий. Вероятно, понижение уровня активности Na^+/K^+ -АТФазы с ростом pH среды до 9,0 может быть связано с замедлением поступления ионов в организм.

Заключение

Результаты проведенного аквариального эксперимента по изучению влияния возрастания солености до 6 ‰ и pH от 7,0 до 9,0 на активность одного из основных ферментов осморегуляции Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах эвригалинного вида рыб – стерляди свидетельствуют о том, что реактивность этого фермента может лежать в основе приспособительных реакций (по компенсаторному типу) и обусловли-

вать успешную акклимацию стерляди при интродукции ее в среду с повышенной соленостью (до 6 ‰) и pH (до 9,0). Активация Na^+/K^+ -АТФазы определена необходимостью сохранения внутреннего ионного гомеостаза в зоне адаптивной пластичности стерляди при увеличении соленостной нагрузки на организм до 6 ‰, которая, как было показано ранее [Хлебович, 2012], оказывается пограничной для течения самых разных физиологических процессов. Кислотно-щелочная регуляция внутренней среды организма рыб, связанная с возрастанием pH воды, приводит к опосредованному неспецифическому подавлению активности Na^+/K^+ -АТФазы, которое, вероятно, может быть следствием синергизма действия ферментов ионного обмена (Na^+/H^+ , $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$) и ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), регулирующих кислотно-щелочное состояние клетки, и Na^+/K^+ -АТФазы, участвующей в минеральном обмене. Активация/реактивация Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах молоди стерляди в условиях соленостного и кислотного воздействия является примером биохимической адаптации при акклимации, направленной на поддержание механизмов обмена веществ и его изменений в зависимости от изменяющихся условий среды. Благодаря этому поддерживается оптимальное микроокружение макромолекул на клеточном уровне, что является одним из главных принципов, определяющих стратегию биохимической адаптации [Хочачка, Сомеро, 1977; Немова, Высоцкая, 2004; Хлебович, 2012].

Авторы благодарят профессора Г. Г. Серпунина за предоставление экспериментального материала.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (Институт биологии КарНЦ РАН, тема № АААА-А17-117031710039-3).

Литература

Алекин О. А. Основы гидрохимии. Л.: Гидрометеоиздат, 1970. 414 с.

Бергер В. Я. Адаптации морских моллюсков к изменениям солености. Л.: Наука, 1986. 216 с.

Болдырев А. А., Кяйвярайнен Е. И., Илюха В. А. Биомембранология: уч. пособие / Ред. С. А. Чепурнов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2006. 226 с.

Виноградов Г. А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. М.: Наука, 2000. 216 с.

Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина, 1969. С. 9–11, 24.

Елаев Н. Р., Семенов Е. В. Изменение активности мембранных АТФаз мозга при воздействии холино- и адреномиметических веществ. Биохимия. 1974. Т. 39, вып. 3. С. 42–46.

Касимов Р. Ю. Сравнительная характеристика поведения дикой и заводской молоди осетровых в раннем онтогенезе. Баку: Элм, 1980. С. 636–640.

Китаев С. П. Основы лимнологии для гидробиологов и ихтиологов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 395 с.

Кузьмичев С. А. Особенности осморегуляции у некоторых видов осетровых рыб при повышении солености: Дис. ... канд. биол. наук. М., 2005. 116 с.

Матей В. Е. Жабры пресноводных костистых рыб. Морфофункциональная организация, адаптация, эволюция. СПб.: Наука, 1996. 204 с.

Моисеев Т. И. Закисление вод: Факторы, механизмы и экологические последствия. М.: Наука, 2003. 276 с.

Наточин Ю. В., Лукьяненко В. И., Лаврова Е. А., Металлов Г. Ф. Обмен магния у русского осетра при различной солености // Вопр. ихтиол. 1980. Т. 20, № 5. С. 892–900.

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

Скадовский С. Н. Экологическая физиология водных организмов. М.: Сов. наука, 1955. 338 с.

Хлебович В. В. Очерки экологии особи. СПб.: ЗИН РАН, 2012. 143 с.

Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. 296 с.

Amiri B. M., Baker D. W., Morgan J. D., Brauner C. J. Size dependent early salinity tolerance in two sizes of juvenile white sturgeon, *Acipenser transmontanus* // Aquacult. 2009. Vol. 286. P. 121–126. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.08.037

Atli G., Canli M. Metals (Ag(+), Cd(2+), Cr(6+)) affect ATPase activity in the gill, kidney, and muscle of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures // Environ. Toxicol. 2013. Vol. 28, no. 12. P. 707–717. doi: 10.1002/tox.20766

Baker D. W., Matey V., Huynh K. T., Wilson J. M., Morgan J. D., Brauner C. J. Complete intracellular pH protection during extracellular pH depression is associated with hypercarbia tolerance in white sturgeon, *Acipenser transmontanus* // Am. J. Physiol. 2009. Vol. 296. P. 1868–1880. doi: 10.1152/ajpregu.90767.2008

Boyd C. E. Water quality for pond aquaculture. Research and development series 43 / International Center for Aquaculture and Aquatic Environments, Auburn, Alabama. 1998.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein binding // Analyt. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Canfield V. A., Loppin B., Thisse B., Thisse C., Postlethwait J. H., Mohideen M.-A. P. K., Rajarao S. J. R., Levenson R. Na, K-ATPase α and β subunit genes exhibit unique expression patterns during zebrafish embryogenesis // Mech. Devel. 2002. Vol. 116. P. 51–59. doi: 10.1016/S0925-4773(02)00135-1

Choe K. P., Morrison-Shetlar A. I., Wall B. P., Claiborne J. B. Immunological detection of Na^+/H^+ -exchang-

ers in the gills of a hagfish, *Myxine glutinosa*, an elasmobranch, *Raja erinacea*, and a teleost, *Fundulus heteroclitus* // *Comp. Biochem. Phys. A Phys.* 2002. Vol. 131. P. 375–385. doi: 10.1016/S1095-6433(01)00491-3

Doğanlı C., Kjaer-Sorensen K., Knoeckel Ch., Beck H. Ch., Nyengaard J. R., Honore B., Nissen P., Ribera A., Oxvig C., Lykke-Hartmann K. The Na^+/K^+ -ATPase is critical for skeletal and heart muscle function in zebrafish // *J. Cell Sci.* 2012. Vol. 125. P. 6166–6175. doi: 10.1242/jcs.115808

Evans D., Piermarini P., Choe K. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste // *Phys. Rev.* 2005. Vol. 85. P. 97–177. doi: 10.1152/physrev.00050.2003

Fenner R. M. *The Conscientious Marine Aquarist. A Commonsense Handbook for Successful Saltwater Hobbyists.* Neptune City, New Jersey, USA: TFH Publ. Inc., 2001. 430 p.

Fiol F., Kültz D. Osmotic stress sensing and signaling in fishes. *FEBS J.* 2007. Vol. 274, no. 22. P. 5790–5798. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.060099.x

Folmar L. C., Dickhoff W. W. The parr-smolt transformation (smoltification) and seawater adaptation in salmonids // *Aquacult.* 1980. Vol. 21. P. 1–37. doi: 10.1016/0044-8486(80)90123-4

Heydarnejad M. S. Survival and growth of common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to different water pH levels // *Turkey J. Veter. Anim. Sci.* 2012. Vol. 36, no. 3. P. 245–249. doi: 10.3906/vet-1008-430

Hirata T., Kaneko T., Ono T., Nakazato T., Furukawa N., Hasegawa S., Wakabayashi S., Shigekawa M., Chang M. H., Romero M. F., Hirose S. Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3.5 lake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003. Vol. 284, no. 5. P. 1199–1212. doi: 10.1152/ajpregu.00267.2002

Kahovcova J., Odavic R. A simple method of the quantitative analysis of phospholipids separated by thin layer chromatography // *J. Chromatogr.* 1969. Vol. 40, no. 1. P. 90–96.

Kulac B., Atli G., Canli M. Response of ATPases in the osmoregulatory tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus* exposed to copper in increased salinity // *Fish Physiol. Biochem.* 2013. Vol. 39, no. 2. P. 391–401. doi: 10.1007/s10695-012-9707-0

Kültz D. Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress // *J. Exp. Biol.* 2015. Vol. 218. P. 1907–1914. doi: 10.1242/jeb.118695

Kültz D., Bastrop R., Jurss K., Siebers D. Mitochondria-rich (MR) cells and the activities of the Na^+/K^+ -ATPase and carbonic anhydrase in the gill and opercular epithelium of *Oreochromis mossambicus* adapted to various salinities // *Comp. Biochem. Phys. B Comp. Biochem.* 1992. Vol. 102. P. 293–301. doi: 10.1016/0305-0491(92)90125-B

McCormick S. D., Sundell K., Bjornsson B. T., Brown C. L., Hiroi J. Influence of salinity on the localization of Na^+/K^+ -ATPase, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the Hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*) // *J. Exp. Biol.* 2003. Vol. 206. P. 4575–4583. doi: 10.1242/jeb.00711

Oseni K. Acute and sub lethal effect of potassium cyanide on the behaviour and ATPase enzyme activity

in the freshwater fish, *Clarias gariepinus* (Catfish) // *International Letters of Natural Sci.* 2015. Vol. 49. P. 50–57. doi: 10.18052/www.scipress.com/ILNS.49.50

Salama A., Morgan I. J., Wood C. M. The linkage between Na uptake and ammonia excretion in rainbow trout: kinetic analysis, the effects of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and NH_4HCO_3 infusion and the influence of gill boundary layer pH // *J. Exp. Biol.* 1999. Vol. 202. P. 697–709.

Shaughnessy C. A., Baker D. W., Brauner C. J., Morgan J. D., Bystriansky J. S. Interaction of osmoregulatory and acid-base compensation in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) during exposure to aquatic hypercarbia and elevated salinity // *J. Exp. Biol.* 2015. Vol. 218. P. 2712–2719. doi: 10.1242/jeb.125567

Skou J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves // *Biochim. Biophys. Acta.* 1957. Vol. 23, no. 2. P. 394–401.

Tipsmark C. K., Madsen S. S., Seidelin M., Christensen A. S., Cutler C. P., Cramb G. Dynamics of Na^+ , K^+ , 2Cl^- Cotransporter and Na^+/K^+ -ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *J. Exp. Zool.* 2002. Vol. 293. P. 106–118. doi: 10.1002/jez.10118

Wang Y. S., Gonzalez R. J., Patrick M. L., Grosell M., Zhang C., Feng Q., Du J. Z., Walsh P. J., Wood C. M. Unusual physiology of scale-less carp, *Gymnocypris przewalskii*, in Lake Qinghai: a high altitude alkaline saline lake // *Comp. Biochem. Phys. A Mol. Integr. Phys.* 2003. Vol. 134. P. 409–421. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00317-3

Wilkie M. P. Ammonia excretion and urea handling by fishes gills: present under standing and future research challenges // *J. Exp. Zool.* 2002. Vol. 293. P. 284–301. doi: 10.1002/jez.10123

Wilkie M. P., Wood C. M. The adaptations of fish to extremely alkaline environments // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 1996. Vol. 113. P. 665–673. doi: 10.1016/0305-0491(95)02092-6

Wilkie M. P., Wright P. A., Iwama G. K., Wood C. M. The physiological responses of the Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*), a resident of highly alkaline Pyramid Lake (pH 9.4), to challenge at pH 10 // *J. Exp. Biol.* 1993. Vol. 175. P. 173–194.

Wilson R. W., Wilson J. M., Grosell M. Intestinal bicarbonate secretion by marine teleost fish – why and how? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 2002. Vol. 1566. P. 182–193. doi: 10.1016/S0005-2736(02)00600-4

Wood C. M. The physiological problems of fish in acid waters // In: Morris R., Taylor E. W., Brown D. J. A. and Brown J. A. (eds). *Acid Toxicity and Aquatic Animals.* Cambridge: Cambridge University Press, 1989. P. 125–152.

Wood C. M., Du J. Z., Rogers J., Brauner C. J., Richards J. G., Semple J. W., Murray B. W., Chen X. Q., Wang X. Przewalski's naked carp (*Gymnocypris przewalskii*): an endangered species taking a metabolic holiday in Lake Qinghai, China // *Phys. Biochem. Zool.* 2007. Vol. 80. P. 59–77. doi: 10.1086/509212

Zweig R. D., Morton J. D., Stewart M. M. Source water quality for aquaculture. The World Bank, Washington, DC. 1999.

Поступила в редакцию 07.06.2018

References

- Alekin O. A.* Osnovy gidrokhimii [Basic hydrochemistry]. Leningrad: Gidrometeoizdat, 1970. 412 p.
- Berger V. Ya.* Adaptatsiya morskikh mollyuskov k izmeneniyam solenosti [Adaptation of marine molluscs to salinity changes]. Leningrad: Nauka, 1986. 216 p.
- Boldyrev A. A., Kaivarainen E. I., Ilyukha V. A.* Biomembranologia: uch. posobie [Biomembranology: tutorial]. Petrozavodsk: KarRC RAS, 2006. 226 p.
- Elaev N. R., Semenov E. V.* Izmenenie aktivnosti membrannykh ATPas mozga pri vozdeistvii kholino- i adrenomimeticheskikh veshchestv [Changes in the activity of brain membrane ATPases under the influence of choline- and adrenomimetic substances]. *Biokhim.* [Biochem.]. 1974. Vol. 39, no. 3. P. 42–46.
- Gubler E. V., Genkin A. A.* Primenenie kriteriev neparametricheskoi statistiki dlya otsenki razlichii dvukh grupp nablyudenii v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh [Application of nonparametric statistic criteria to assess differences in the two groups of observations in biomedical research]. Moscow: Meditsina, 1969. P. 9–11, 24.
- Kasimov R. Yu.* Sravnitel'naya kharakteristika povedeniya dikoi i zavodskoi molodi osetrovyykh v rannem ontogeneze [Comparative characteristics of wild and plant young sturgeon behavior in early ontogenesis]. Baku: ELM, 1980. P. 636–640.
- Khlebovich V. V.* Ocherki ekologii osobi [Essays on the ecology of the individual]. St. Petersburg: ZIN RAN, 2012. 143 p.
- Khochachka P., Somero J.* Strategiya biokhimicheskoi adaptatsii [Strategy of biochemical adaptation]. Moscow: Mir, 1977. 296 p.
- Kिताев S. P.* Osnovy limnologii dlya gidrobiologov i ikhtologov [Basics of limnology for hydrobiologists and ichthyologists]. Petrozavodsk: KarRC RAS, 2007. 395 p.
- Kuz'michev S. A.* Osobennosti osmoregulyatsii u nekotorykh vidov osetrovyykh ryb pri povyshenii solenosti [Features of osmoregulation in some species of sturgeon with increasing salinity]: DSc (Cand. of Biol.) thesis. Moscow, 2005. 116 p.
- Matei V. E.* Zhabry presnovodnykh kostistyykh ryb. Morfofunktsional'naya organizatsiya, adaptatsiya, evolyutsiya [Gills of freshwater teleosts. Morphofunctional organization, adaptation, evolution]. St. Petersburg: Nauka, 1996. 204 p.
- Moiseenko T. I.* Zakislenie vod: factory, mekhanizmy i ekologicheskie posledstviya [Water acidification: factors, mechanisms and environmental effects]. Moscow: Nauka, 2003. 276 p.
- Natochin Yu. V., Luk'yanenko V. I., Lavrova E. A., Metallov G. F.* Obmen magniya u russkogo osetra pri razlichnoi solenosti [Exchange of magnesium from Russian sturgeon at different salinity]. *Vopr. ikhtiol.* [Russ. J. Ichthyol.]. 1980. Vol. 20, no. 5. P. 892–900.
- Nemova N. N., Vysotskaya R. Yu.* Biokhimicheskaya indikatsiya sostoyaniya ryb [Biochemical indication of fish status]. Moscow: Nauka, 2004. 215 p.
- Skadovskii S. N.* Ekologicheskaya fiziologiya vodnykh organizmov [Ecological physiology of water organisms]. Moscow: Sov. nauka, 1955. 338 p.
- Vinogradov G. A.* Protsessy ionnoi regulyatsii u presnovodnykh ryb i bespozvonochnykh [The processes of ion regulation in freshwater fish and invertebrates]. Moscow: Nauka, 2000. 216 p.
- Amiri B. M., Baker D. W., Morgan J. D., Brauner C. J.* Size dependent early salinity tolerance in two sizes of juvenile white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquacult.* 2009. Vol. 286. P. 121–126. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.08.037
- Atli G., Canli M.* Metals (Ag(+), Cd(2+), Cr(6+)) affect ATPase activity in the gill, kidney, and muscle of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures. *Environ. Toxicol.* 2013. Vol. 28, no. 12. P. 707–717. doi: 10.1002/tox.20766
- Baker D. W., Matey V., Huynh K. T., Wilson J. M., Morgan J. D., Brauner C. J.* Complete intracellular pH protection during extracellular pH depression is associated with hypercarbia tolerance in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Am. J. Physiol.* 2009. Vol. 296. P. 1868–1880. doi: 10.1152/ajpregu.90767.2008
- Boyd C. E.* Water quality for pond aquaculture. Research and development series 43. *International Center for Aquaculture and Aquatic Environments*, Auburn, Alabama. 1998.
- Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principal of protein binding. *Analyt. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
- Canfield V. A., Loppin B., Thisse B., Thisse C., Postlethwait J. H., Mohideen M.-A. P. K., Rajarao S. J. R., Levenson R.* Na, K-ATPase α and β subunit genes exhibit unique expression patterns during zebrafish embryogenesis. *Mech. Develop.* 2002. Vol. 116. P. 51–59. doi: 10.1016/S0925-4773(02)00135-1
- Choe K. P., Morrison-Shetlar A. I., Wall B. P., Claiborne J. B.* Immunological detection of Na⁺/H⁺-exchangers in the gills of a hagfish, *Myxine glutinosa*, an elasmobranch, *Raja erinacea*, and a teleost, *Fundulus heteroclitus*. *Comp. Biochem. Phys. A Phys.* 2002. Vol. 131. P. 375–385. doi: 10.1016/S1095-6433(01)00491-3
- Doğanlı C., Kjaer-Sorensen K., Knoeckel Ch., Beck H. Ch., Nyengaard J. R., Honore B., Nissen P., Ribera A., Oxvig C., Lykke-Hartmann K.* The α 2Na⁺/K⁺-ATPase is critical for skeletal and heart muscle function in zebrafish. *J. Cell Sci.* 2012. Vol. 125. P. 6166–6175. doi: 10.1242/jcs.115808
- Evans D., Piermarini P., Choe K.* The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Phys. Rev.* 2005. Vol. 85. P. 97–177. doi: 10.1152/physrev.00050.2003
- Fenner R. M.* The Conscientious Marine Aquarist. A Commonsense Handbook for Successful Saltwater Hobbyists. Neptune City, New Jersey, USA: TFH Publications Inc., 2001. 430 p.
- Fiol F., Kültz D.* Osmotic stress sensing and signaling in fishes. *FEBS J.* 2007. Vol. 274, no. 22. P. 5790–5798. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.060099.x
- Folmar L. C., Dickhoff W. W.* The parr-smolt transformation (smoltification) and seawater adaptation in salmonids. *Aquacult.* 1980. Vol. 21. P. 1–37. doi: 10.1016/0044-8486(80)90123-4

Heydarnejad M. S. Survival and growth of common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to different water pH levels. *Turkey J. Veter. Anim. Sci.* 2012. Vol. 36, no. 3. P. 245–249. doi: 10.3906/vet-1008-430

Hirata T., Kaneko T., Ono T., Nakazato T., Furukawa N., Hasegawa S., Wakabayashi S., Shigekawa M., Chang M. H., Romero M. F., Hirose S. Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3.5 lake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003. Vol. 284, no. 5. P. 1199–1212. doi: 10.1152/ajpregu.00267.2002

Kahovcova J., Odavic R. A simple method of the quantitative analysis of phospholipids separated by thin layer chromatography. *J. Chromatogr.* 1969. Vol. 40, no. 1. P. 90–96.

Kulac B., Atli G., Canli M. Response of ATPases in the osmoregulatory tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus* exposed to copper in increased salinity. *Fish Physiol. Biochem.* 2013. Vol. 39, no. 2. P. 391–401. doi: 10.1007/s10695-012-9707-0

Kültz D. Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress. *J. Exp. Biol.* 2015. Vol. 218. P. 1907–1914. doi: 10.1242/jeb.118695

Kültz D., Bastrop R., Jurss K., Siebers D. Mitochondria-rich (MR) cells and the activities of the Na⁺/K⁺-ATPase and carbonic anhydrase in the gill and opercular epithelium of *Oreochromis mossambicus* adapted to various salinities. *Comp. Biochem. Phys. B Comp. Biochem.* 1992. Vol. 102. P. 293–301. doi: 10.1016/0305-0491(92)90125-B

McCormick S. D., Sundell K., Bjornsson B. T., Brown C. L., Hiroi J. Influence of salinity on the localization of Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the Hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*). *J. Exp. Biol.* 2003. Vol. 206. P. 4575–4583. doi: 10.1242/jeb.00711

Oseni K. Acute and sub lethal effect of potassium cyanide on the behaviour and ATPase enzyme activity in the freshwater fish, *Clarias gariepinus* (Catfish). *International Letters of Natural Sci.* 2015. Vol. 49. P. 50–57. doi: 10.18052/www.scipress.com/ILNS.49.50

Salama A., Morgan I. J., Wood C. M. The linkage between Na uptake and ammonia excretion in rainbow trout: kinetic analysis, the effects of (NH₄)₂SO₄ and NH₄HCO₃ infusion and the influence of gill boundary layer pH. *J. Exp. Biol.* 1999. Vol. 202. P. 697–709.

Shaughnessy C. A., Baker D. W., Brauner C. J., Morgan J. D., Bystriansky J. S. Interaction of osmoregulatory and acid-base compensation in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) during exposure to aquatic hypercarbia and elevated salinity. *J. Exp. Biol.* 2015. Vol. 218. P. 2712–2719. doi: 10.1242/jeb.125567

Skou J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta.* 1957. Vol. 23, no. 2. P. 394–401.

Tipsmark C. K., Madsen S. S., Seidelin M., Christensen A. S., Cutler C. P., Cramb G. Dynamics of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ Cotransporter and Na⁺/K⁺-ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Exp. Zool.* 2002. Vol. 293. P. 106–118. doi: 10.1002/jez.10118

Wang Y. S., Gonzalez R. J., Patrick M. L., Grosell M., Zhang C., Feng Q., Du J. Z., Walsh P. J., Wood C. M. Unusual physiology of scale-less carp, *Gymnocypris przewalskii*, in Lake Qinghai: a high altitude alkaline saline lake. *Comp. Biochem. Phys. A Mol. Integr. Phys.* 2003. Vol. 134. P. 409–421. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00317-3

Wilkie M. P. Ammonia excretion and urea handling by fishes gills: present understanding and future research challenges. *J. Exp. Zool.* 2002. Vol. 293. P. 284–301. doi: 10.1002/jez.10123

Wilkie M. P., Wood C. M. The adaptations of fish to extremely alkaline environments. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 1996. Vol. 113. P. 665–673. doi: 10.1016/0305-0491(95)02092-6

Wilkie M. P., Wright P. A., Iwama G. K., Wood C. M. The physiological responses of the Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*), a resident of highly alkaline Pyramid Lake (pH 9.4), to challenge at pH 10. *J. Exp. Biol.* 1993. Vol. 175. P. 173–194.

Wilson R. W., Wilson J. M., Grosell M. Intestinal bicarbonate secretion by marine teleost fish – why and how? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 2002. Vol. 1566. P. 182–193. doi: 10.1016/S0005-2736(02)00600-4

Wood C. M. The physiological problems of fish in acid waters In: Morris R., Taylor E. W., Brown D. J. A. and Brown J. A. (eds). *Acid Toxicity and Aquatic Animals*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. P. 125–152.

Wood C. M., Du J. Z., Rogers J., Brauner C. J., Richards J. G., Semple J. W., Murray B. W., Chen X. Q., Wang X. Przewalski's naked carp (*Gymnocypris przewalskii*): an endangered species taking a metabolic holiday in Lake Qinghai, China. *Phys. Biochem. Zool.* 2007. Vol. 80. P. 59–77. doi: 10.1086/509212

Zweig R. D., Morton J. D., Stewart M. M. *Source water quality for aquaculture*. The World Bank, Washington, DC. 1999.

Received June 07, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кайвярайнен Елена Ивановна
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: hela_kaiv@mail.ru

CONTRIBUTORS:

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

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

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

УДК 574.24:597.55

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ В ОРГАНАХ САМОК КОЛЮШКИ (*GASTEROSTEUS ACULEATUS* LINNAEUS) В НЕРЕСТОВЫЙ ПЕРИОД

М. Ю. Крупнова¹, Т. С. Иванова², Н. Н. Немова¹

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

Приведены результаты исследования активности лизосомальных протеиназ (катепсина В и D) в органах (мышцы, печень, жабры, гонады) колюшки трехиглой (*Gasterosteus aculeatus* L.) в нерестовый период из различающихся по гидрологическим и экологическим факторам биотопов Белого моря. В начале нерестового хода наиболее высокая активность катепсина В в мышцах и печени самок колюшки характерна для рыб из губы Сельдяная, что говорит о сравнительно высоком протеолитическом потенциале аутофагического типа у этих рыб. К концу нереста активность катепсина В в мышцах и печени колюшки из лагуны Сухая и из пролива Сухая Салма повышается, а у рыб из губы Сельдяная снижается. Увеличение к концу нереста активности катепсина D в мышцах колюшки из губы Сельдяная и особенно из пролива Сухая Салма на фоне небольшого ее снижения у рыб из лагуны Сухая позволяет сделать предположение о синергическом, хотя и разнонаправленном, характере изменения активности катепсина В и D во внутриклеточном протеолизе у самок колюшки из разных биотопов в процессе нереста. Результаты исследований свидетельствуют о наличии корреляции между активностью изученных ферментов, временем нереста (май/июль) колюшки и условиями местообитаний. При этом ведущим фактором, влияющим на активность лизосомальных протеиназ и, соответственно, на гидролиз белков у колюшки в этот период являются, по-видимому, физиологические изменения в организме рыб, направленные на завершение нереста и готовность рыб к последующему оплодотворению.

Ключевые слова: лизосомы; катепсин В; катепсин D; развитие; колюшка; биотоп; Белое море.

M. Yu. Krupnova, T. S. Ivanova, N. N. Nemova. THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEASES IN THE ORGANS OF FEMALE THREESPINNE STICKLEBACK (*GASTEROSTEUS ACULEATUS* LINNAEUS) IN THE SPAWNING PERIOD

The results of a study on the spawning-period activity of lysosomal proteases (cathepsins B and D) in the organs (muscles, liver, gills, gonads) of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from hydrologically and ecologically different White Sea habitats are presented. At the beginning of the spawning run, the highest activity of cathepsin B in the muscles and liver was revealed in female fish from Seldyanaya Bay, indicating a relatively high autophagy-type proteolytic potential in these fish. By the end of the spawning period, muscular and hepatic cathepsin B activity rises in stickleback from Sukhaya Lagoon and Sukhaya Salma Strait, but declines in fish from Seldyanaya Bay. The increased

activity of cathepsin D in the muscles of stickleback from Seldyanaya Bay and especially from Sukhaya Salma Strait alongside its slight reduction in fish from Sukhaya Lagoon in the end of the spawning season leads to the assumption about a synergetic although differently directed pattern of change in the activity of cathepsins D and B in intracellular proteolysis in female stickleback from different habitats during spawning. The study results indicate there is a correlation between the activity of the studied enzymes in stickleback, the spawning time (May and July), and habitat conditions. The leading factor for the activity of lysosomal proteases and, accordingly, for protein hydrolysis in stickleback in this period apparently are the physiological changes the body of the fish undergoes to be able to complete the spawning and prepare for the following fertilization.

Key words: lysosomes; cathepsins B; cathepsins D; development; stickleback; habitat; White Sea.

Введение

Трехиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* является доминирующим видом промежуточного уровня трофической цепи Белого моря, имеет достаточно короткий жизненный цикл, половозрелыми рыбы становятся в три года [Зюганов, 1991]. Этот вид достигает высокой численности и перед началом нереста перемещается из открытого моря в прибрежные мелководные участки, различающиеся между собой по солености, интенсивности водообмена, температуре и трофике [Пономарев, 2004; Ершов, 2011; Лайус, 2013; Ivanova, 2016]. Известно, что физиолого-биохимические процессы развития организмов находятся под контролем сложной системы регуляции, в том числе с участием ферментов системы внутриклеточного протеолиза [Дин, 1981; Лысенко и др., 2011]. Один из путей внутриклеточного протеолиза – лизосомально-аутофагический – включает комплекс протеолитических ферментов, основными из которых являются цистеинзависимая протеиназа – катепсин В (КФ 3.4.22.1) и аспартатная – катепсин D (КФ 3.4.23.5), при этом известно, что за начальные реакции гидролиза белков в лизосомах отвечают эндопротеиназы, типичной из которых является катепсин D, а завершают этот процесс другие эндо- и экзопротеиназы лизосом [Дин, 1981; Bohley, 1987].

В настоящей работе исследовали активность катепсинов В и D в органах колюшки трехиглой в начале (весенне-летний период – май) и в конце нереста (июль) из разных биотопов (нерестилищ) Белого моря, различающихся рядом экологических факторов.

Материалы и методы

Колюшку отлавливали в Белом море в трех биотопах. Сельдяная губа характеризуется интенсивным водообменом, вызванным при-

ливами (амплитуда до 2 м). Средняя температура воды в период сбора материала в начале нереста составляла 15 °С, соленость – 23 ‰, в конце нереста – 20 °С и 24 ‰. Биотоп под названием Сухая Салма характеризуется более интенсивным водообменом и более низкой температурой (12 °С) в начале нереста, соленостью 21 ‰, к концу нереста температура воды в момент сбора материала – 12 °С, соленость – 20 ‰. В лагуне Сухая, в отличие от вышеназванных биотопов, очень слабый водообмен, температура воды в мае 16 °С, в июле 20 °С, соленость 15 и 19 ‰ соответственно. Помимо температуры и солености исследуемые биотопы различались водной растительностью: в биотопе губа Сельдяная преобладали фукоиды на литорали и густые заросли зостеры на большей части акватории; в проливе Сухая Салма растительность была представлена фукусами на камнях, а в более глубокой части акватории – зостерой; в лагуне Сухая растительность характеризовалась большим количеством зарослей нитчатки, отсутствием фукусов и зостерой, растущей только в определенных участках акватории.

Активность протеиназ определяли в мышцах, печени, жабрах и гонадах самок колюшки.

После гомогенизации образцов в соотношении 1:10 (вес/об.) в растворе 0,25 М сахарозы с добавлением 0,01 % Тритона X-100 (Merck) (1200 об/мин, 60 с) и их центрифугирования (10000 g, 30 мин) в супернатанте определяли активность катепсина В по расщеплению 0,065 М раствора этилового эфира гидрохлорида N-бензоил L-аргинина в 0,1 М ацетатном буфере (pH 5,0) [Matsuda, Misaka, 1974] и катепсина D по гидролизу 1%-го бычьего гемоглобина в 0,1 М ацетатном буфере (pH 3,6) согласно модифицированному методу Ансона [Barrett, Heath, 1977]. Активность катепсинов В и D (ед. акт.) выражали в единицах изменения оптического поглощения при E_{525} и E_{280} соответст-

Таблица 1. Активность катепсина В в органах самок колюшки, выловленной в разных биотопах Белого моря в начале (май) и в конце (июль) нереста (ед. акт.), n=7–10

Table 1. The activity of cathepsin B in the bodies of females of the three-spined stickleback in different biotopes of the White Sea at the beginning (May) and end (July) of the spawning (units of the act.), n=7–10

Биотоп Biotope	губа Сельдяная Seldyanaya Bay		пролив Сухая Салма Sukhaya Salma Strait		лагуна Сухая Sukhaya Lagoon	
	Май May (23 ‰, 15 °С)	Июль July (24 ‰, 20 °С)	Май May (21 ‰, 12 °С)	Июль July (20 ‰, 22 °С)	Май May (15 ‰, 16 °С)	Июль July (19 ‰, 20 °С)
Мышцы Muscles	1,10 ± 0,11	0,40 ^{xx} ± 0,05	0,50 [*] ± 0,09	1,30 [*] ± 0,10	0,09 [*] ± 0,0	0,33 ^{xx} ± 0,04
Печень Liver	0,93 ± 0,08	0,50 ± 0,04	0,52 [*] ± 0,06	1,20 [*] ± 0,09	0,07 [*] ± 0,0	0,43 ^{xx} ± 0,07
Жабры Gills	1,50 ± 0,10	0,40 ^{xx} ± 0,03	1,90 ± 0,10	1,9 [*] ± 0,10	0,24 [*] ± 0,04	0,47 ± 0,06
Гонады Gonads	1,40 ± 0,11	0,6 ^{xx} ± 0,06	1,9 ± 0,14	1,2 ± 0,10	0,12 [*] ± 0,01	0,12 [*] ± 0,04

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – различия достоверны по сравнению с самками из губы Сельдяная, $p \leq 0,05$, критерий U Манна – Уитни; ** – различия в начале и конце нереста между органами самок из одного биотопа достоверны, $p \leq 0,01$, критерий U Манна – Уитни.

Note. Here and in Table 2: * – differences are significant in comparison with females from Seldyanaya Bay, $p \leq 0,05$, Mann-Whitney U test; ** – differences at the beginning and end of spawning between the organs of females from one biotope are significant, $p \leq 0,01$, Mann-Whitney U test.

венно, на 1 мг белка за 1 ч инкубации (37 °С). Количественное содержание растворимого белка в тканях (мг/г ткани) определяли по методу М. Бредфорда [Bradford, 1976], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Достоверность различий между показателями активности ферментов в органах сельди из различных мест обитания оценивали с помощью однофакторного дисперсного анализа One-Way Analysis of Variance (Anova). Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$ [Коросов, Горбач, 2007].

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

Результаты

Масса и общая длина тела колюшки из разных биотопов практически не различаются. Средняя масса рыб составляла 3–4 г, а длина тела – 6,0 см. Активность лизосомальных протеиназ в органах колюшки из разных мест обитания в начале и в конце нереста приведена в таблицах 1 и 2.

Катепсин В. Сравнение активности катепсина В в исследуемых органах колюшки, отловленной в мае (начало нереста) и июле (конец нереста), свидетельствует, что если у рыб из биотопов губа Сельдяная и лагуна Сухая активность фермента достоверно снижается (за

исключением гонад у колюшки из лагуны Сухая), то у рыб из пролива Сухая Салма отмечена обратная зависимость (табл. 1). При этом следует отметить, что наибольшее снижение активности катепсина В к концу нереста в биотопе губа Сельдяная было обнаружено в жабрах колюшки (в 3,8 раза), у особей из лагуны Сухая – в печени (в 6,1 раза), а у рыб из пролива Сухая Салма активность протеиназы увеличилась к концу нереста преимущественно в мышцах и печени (в 2,6 и 2,4 раза). В мае в мышцах и печени колюшки из биотопа губа Сельдяная активность фермента примерно вдвое выше, чем у рыб из лагуны Сухая, и в 10 раз выше, чем в соответствующих органах у особей из лагуны Сухая. У рыб, отловленных в июле, активность катепсина В была наиболее высокой во всех исследованных органах у особей, обитающих в проливе Сухая Салма (в 2–5 раз, а в гонадах – в 10).

Катепсин D. Достоверные различия в активности катепсина D между колюшками, отловленными из всех биотопов в мае и в июле, обнаружены в жабрах, причем если для рыб из губы Сельдяная и из лагуны Сухая активность фермента в жабрах снижалась к концу нереста в 11 и 3,5 раза соответственно, то у особей из пролива Сухая Салма активность исследуемой протеиназы увеличивалась в 10 раз (табл. 2). В мышцах и печени исследуемых рыб в начале и конце нереста активность фермента также увеличивалась, однако достоверные различия показаны только для колюшки из пролива Сухая Салма и лагуны Сухая. В гонадах колюш-

Таблица 2. Активность катепсина D в органах самок колюшки, выловленной в разных биотопах Белого моря в начале (май) и в конце (июль) нереста (ед. акт.), n=7–10

Table 2. The activity of cathepsin D in the bodies of females of the three-spined stickleback in different biotopes of the White Sea at the beginning (May) and end (July) of the spawning (units of the act.), n=7–10

Биотоп Biotope	Губа Сельдяная Seldyanaya Bay		Пролив Сухая Салма Sukhaya Salma Strait		Лагуна Сухая Sukhaya Lagoon	
	Май May (23 ‰, 15 °C)	Июль July (24 ‰, 20 °C)	Май May (21 ‰, 12 °C)	Июль July (20 ‰, 22 °C)	Май May (15 ‰, 16 °C)	Июль July (19 ‰, 20 °C)
Мышцы Muscles	0,04 ± 0,0	0,07 ± 0,0	0,05 ± 0,01	0,26 ^{xx} ± 0,03	0,16 ^x ± 0,04	0,11 ± 0,02
Печень Liver	0,14 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,49 ^{xx} ± 0,09	0,12 ± 0,03	0,24 ^{xx} ± 0,05
Жабры Gills	1,10 ± 0,10	0,10 ^{xx} ± 0,02	0,19 ^x ± 0,04	1,9 ^{xx} ± 0,14 ^x	0,42 ^x ± 0,07	0,12 ^{xx} ± 0,03
Гонады Gonads	0,15 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,10 ± 0,0

ки различия в активности катепсина D между началом и завершением нереста незначительны. В мае наибольшая активность катепсина D обнаружена в жабрах рыб из всех исследуемых биотопов, а в июле – в печени колюшки из губы Сельдяная и из лагуны Сухая.

Активность катепсинов B и D во всех органах рыб из лагуны Сухая к концу нереста повышается, в гонадах и жабрах рыб из губы Сельдяная и пролива Сухая Салма – снижается. В мышцах и печени колюшки из губы Сельдяная и пролива Сухая Салма к завершению нереста активность катепсина B повышается, а активность катепсина D снижается.

Обсуждение

Результаты исследований активности основных лизосомальных протеиназ рыб – катепсинов B и D в начале и в конце нереста в некоторых органах самок колюшки, обитающих в биотопах, различающихся по гидрологическим и экологическим характеристикам, свидетельствуют о разнонаправленном характере изменений активности катепсинов B и D, зависящем прежде всего от времени нереста, а также от избираемого биотопа и исследуемого органа. Следует отметить, что ранее при изучении влияния различных факторов среды (биотических и абиотических) на лизосомальный протеолиз в органах и тканях рыб было также показано, что активность катепсина B и D изменяется в разных направлениях [Немова, 1996; Немова и др., 2016; Крупнова и др., 2016]. Сравнительно высокая активность катепсина B в мышцах и печени самок колюшки из губы Сельдяная и пролива Сухая Салма, отловленных на нерестилищах в мае и июле, говорит о высоком протеолитическом потенциале ау-

тофагического типа у этих рыб. Катепсин B, как известно, является основной регуляторной протеиназой лизосом животных тканей, в том числе рыб, необходимой для гидролиза белков мышц с целью последующего их использования в биосинтетических процессах при формировании белков гонад самок рыб [Overturf, Gaylord, 2009; Немова и др., 2016]. Потребность в пластическом материале для биосинтезов у рыб в процессе нереста сопровождается так называемым «нерестовым истощением», связанным с интенсификацией протеолитических и липолитических процессов, прежде всего в мышечной ткани. Известно, что если в начале нерестового периода основные затраты на обеспечение энергией рыб идут за счет липидов, то в конце нереста немаловажная функция отводится белкам [Overturf, Gaylord, 2009].

Сравнительно высокая активность катепсинов B и D в жабрах колюшки из всех исследуемых биотопов (за исключением колюшки, отловленной в мае из лагуны Сухая), скорее всего, объясняется тем, что особи, пришедшие на нерестилища, сталкиваются с необходимостью адаптации к новой среде обитания, которая характеризуется специфической соленостью, температурой, трофикой, отличной от таковой в местообитаниях, в которых они нагуливались. При этом следует заметить, что жабры являются одним из основных органов осморегуляции как у стеногалинных, так и у эвригалинных рыб, к которым относится колюшка трехиглая [Матей, 1996; Виноградов, 2000]. Сравнительно низкая активность катепсина B в органах колюшки, отловленной в мае из лагуны Сухая (в мышцах, печени и гонадах – в 12 раз, в жабрах – в 4 раза ниже по сравнению с колюшкой из губы Сельдяная), может быть связана не только с температурой и трофикой,

но и с соленостью (15 ‰ в лагуне Сухая против 21 и 23 ‰ в других биотопах). Известно, что проницаемость жаберного эпителия при понижении солености снижается, и это приводит к уменьшению потока ионов в организм и активации ионов транспортных систем [Виноградов, 2000]. Аналогичные данные об изменении активности катепсина В были получены при исследовании влияния солености и кислотности среды на активность ферментов осморегуляции и лизосомальных протеиназ в органах стерляди [Крупнова и др., 2009]. Что касается влияния температуры биотопа, то этот фактор, скорее всего, не оказывает значительного воздействия на активность лизосомальных протеиназ колюшки. Об этом говорят и сравнительно небольшие различия в уровне активности катепсина у рыб из Сельдяной бухты и пролива Сухая Салма (разница между температурой в начале и в конце нереста 5 и 10 °С соответственно).

Таким образом, приведенные в работе данные об изменении активности катепсина В и D в органах колюшки свидетельствуют, что, скорее всего, ведущим фактором, влияющим на активность лизосомальных протеиназ и, соответственно, на гидролиз белков у колюшки в нерестовый период, являются физиологические изменения в организме рыб, сопровождающие готовность к выметыванию половых продуктов и последующему оплодотворению. При этом нельзя исключать и влияния условий, складывающихся на нерестилищах (биотопах), прежде всего трофических и в меньшей степени таких факторов, как соленость и температура. Ранее было высказано положение, что по гидрологическим и трофическим характеристикам губа Сельдяная является наиболее оптимальным биотопом для нереста колюшки [Лайус и др., 2013]. Данные, полученные в исследовании активности ферментов лизосомального протеолиза у колюшки трехиглой из разных нерестилищ Белого моря, частично это подтверждают. Несмотря на то что изменения активности катепсина в органах колюшки из разных биотопов в период нереста носят разнонаправленный характер, можно предположить их синергическое действие во внутрилизосомальном протеолизе.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема «Биохимические механизмы, определяющие сходство и различия в развитии адаптаций у гидробионтов морских и пресноводных экосистем»).

Литература

- Виноградов Г. А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. М.: Наука, 2000. 216 с.
- Дин Р. Процессы распада в клетке. М.: Мир, 1981. 120 с.
- Ершов П. Н. О плодовитости трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758 Кандалакшского залива Белого моря // Вестн. СПбГУ. 2011. Сер. 3. Вып. 4. С. 19–24.
- Зюганов В. В. Семейство колюшковых (*Gasterosteidae*) мировой фауны // Фауна СССР. Рыбы. Л.: Наука, 1991. Т. 5, вып. 1. 266 с.
- Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных. Петрозаводск: ПетрГУ, 2007. 76 с.
- Крупнова М. Ю., Кяйвяряйнен Е. И., Борвинская Е. В., Немова Н. Н., Серпунин Г. Г. Влияние солености и кислотности среды на активность ферментов осморегуляции и протеолиза молоди стерляди (*Acipenser ruthenus* L.) // Известия КГТУ. 2009. № 15. С. 18–23.
- Крупнова М. Ю., Вдовиченко Е. А., Высоцкая Р. У., Ефремов Д. А., Веселов А. Е., Немова Н. Н. Активность лизосомальных гидролаз (протеиназ и нуклеаз) у разновозрастной молоди лосося (*Salmo salar* L.) из р. Индера // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 11. С. 39–48. doi: 10.17076/eb449
- Лайус Д. Л., Иванова Т. С., Шатских Е. В., Иванов М. В. «Волны жизни» беломорской колюшки // Природа. 2013. № 4(1172). С. 43–52.
- Лысенко Л. А., Немова Н. Н., Канцерова Н. П. Протеолитическая регуляция биологических процессов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 482 с.
- Матей В. Е. Жабры пресноводных костистых рыб. Морфофункциональная организация, адаптация, эволюция. СПб.: Наука, 1996. 204 с.
- Немова Н. Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 1996. 104 с.
- Немова Н. Н., Крупнова М. Ю., Мурзина С. А. Активность лизосомальных протеиназ (катепсина В и D) в органах сельди *Clupea pallasimaris albi* Berg (Clupeidae) из разных заливов Белого моря // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 6. С. 74–80. doi: 10.17076/eb349
- Пономарев С. А. Питание и пищевые взаимоотношения рыб прибрежных экосистем Кандалакшского залива Белого моря: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2004. 25 с.
- Barrett A. J., Heath M. Lysosomal enzymes // Dingle J. T. (ed.). Lysosomes. A laboratory handbook. Amsterdam, 1977. P. 19–27.
- Bohley P. Intracellular proteolysis // Hydrolytic enzymes. Biomedical division. 1987. P. 307–332.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analit. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
- Ivanova T. S., Ivanov M. V., Golovin P. V., Polyakova N. V., Lajus D. L. The White Sea threespine stickleback population: spawning habitats, mortality, abundance // Evol. Ecol. Res. 2016. Vol. 17(3). P. 301–315.

Matsuda K., Misaka E. Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. I. Purification and multiple forms // *J. Biochem.* 1974. Vol. 76, no. 3. P. 639–649.

Overturf K., Gaylord T. G. Determination of relative protein degradation activity at different life stages in rain-

bow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2009. Vol. 152. P. 150–160.

Поступила в редакцию 26.06.2018

References

Din R. Protsessy raspada v kletke [Cellular degradative processes]. Moscow: Mir, 1981. 120 p.

Ershov P. N. O plodovitosti trekhigloi kolyushki *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758 Kandalakshskogo zaliva Belogo morya [On fecundity of three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758 of the Kandalaksha Gulf of the White Sea]. *Vestn. SPbGU* [Vestnik St. Petersburg Univ.]. 2011. Vol. 3, iss. 4. P. 19–24.

Korosov A. V., Gorbach V. V. Komp'yuternaya obrabotka biologicheskikh dannykh [Computer processing of biological data]. Petrozavodsk: PetrGU, 2007. 76 p.

Krupnova M. Yu., Kyaiyaryainen E. I., Borvinskaya E. V., Nemova N. N., Serpunin G. G. Vliyanie solenosti i kislotnosti sredy na aktivnost' fermentov osmoregulyatsii i proteoliza molodi sterlyadi (*Acipenser ruthenus* L.) [Influence of salinity and acidity of environment on activity of osmoregulation and proteolyses enzymes of young fish sterlets (*Acipenser ruthenus* L.)]. *Izvestiya KGTU* [Proceed. KSTU]. 2009. No. 15. P. 18–23.

Krupnova M. Yu., Vdovichenko E. A., Vysotskaya R. U., Efremov D. A., Veselov A. E., Nemova N. N. Aktivnost' lizosomal'nykh gidrolaz (proteinaz i nukleaz) u raznovozrastnoi molodi lososya (*Salmo salar* L.) iz r. Indera [The activity of lysosomal hydrolases (proteases and nucleases) in salmon (*Salmo salar* L.) juveniles of different age categories from the Indera River]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KaRC RAS]. 2016. No. 11. P. 39–48. doi: 10.17076/eb449

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(1172). P. 43–52.

Lysenko L. A., Nemova N. N., Kantserova N. P. Proteoliticheskaya regulyatsiya biologicheskikh protsessov [Proteolytic regulation of biological processes]. Petrozavodsk: KarRC RAS, 2011. 482 p.

Matei V. E. Zhabry presnovodnykh kostistyykh ryb. Morfofunktsional'naya organizatsiya, adaptatsiya, evolyutsiya [Gills of freshwater teleosts. Morphofunctional organization, adaptation, evolution]. St. Petersburg: Nauka, 1996. 204 p.

Nemova N. N. Vnutrikletochnye proteoliticheskie fermenty u ryb [Intracellular proteolytic enzymes of fish]. Petrozavodsk: KarRC RAS, 1996. 104 p.

Nemova N. N., Krupnova M. Yu., Murzina S. A. Aktivnost' lizosomal'nykh proteinaz (katepsinov B i D) v organakh sel'di *Clupea pallasimaris albi* Berg (Clupeidae) iz raznykh zalivov Belogo morya [Activities of lysosomal proteases (cathepsins B and D) in tissues of the Ehte Sea herring, *Clupea pallasimaris albi* Berg (Clupeidae), inhabiting different bays of the White Sea]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2016. No. 6. P. 74–80. doi: 10.17076/eb349

Ponomarev S. A. Pitanie i pishchevye vzaimootnosheniya ryb pribrezhnykh ekosistem Kandalakshskogo zaliva Belogo morya [Feeding and feeding relationships of fish of the coastal ecosystem of the Kandalaksha Gulf in the White Sea]: Summary of PhD (Cand. of Biol.) thesis. Moscow, 2004. 25 p.

Vinogradov G. A. Protsessy ionnoi regulyatsii u presnovodnykh ryb i bespozvonochnykh [The processes of ion regulation in freshwater fish and invertebrates]. Moscow: Nauka, 2000. 216 p.

Zyuganov V. V. Semeistvo kolyushkovykh (Gasterosteidae) mirovoi fauny [The Gasterosteidae family in the world fauna]. *Fauna SSSR. Ryby* [Fauna of the USSR. Fish]. Leningrad: Nauka, 1991. Vol. 5, no. 1. 266 p.

Barrett A. J., Heath M. Lysosomal enzymes. In: Dingle J. T. (ed.). *Lysosomes. A laboratory handbook*. Amsterdam, 1977. P. 19–27.

Bohley P. Intracellular proteolysis. *Hydrolytic enzymes. Biomedical division*. 1987. P. 307–332.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analit. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.

Ivanova T. S., Ivanov M. V., Golovin P. V., Polyakova N. V., Laius D. L. The White Sea threespine stickleback population: spawning habitats, mortality, abundance. *Evol. Ecol. Res.* 2016. Vol. 17(3). P. 301–315.

Matsuda K., Misaka E. Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. I. Purification and multiple forms. *J. Biochem.* 1974. Vol. 76, no. 3. P. 639–649.

Overturf K., Gaylord T. G. Determination of relative protein degradation activity at different life stages in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 2009. Vol. 152. P. 150–160.

Received June 26, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Крупнова Марина Юрьевна

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: mukrupnova@rambler.ru

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

CONTRIBUTORS:

Krupnova, Marina

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

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 576.311.344:597.5 (268.46)

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ОРГАНАХ КОЛЮШКИ ТРЕХИГЛОЙ ИЗ РАЗНЫХ БИОТОПОВ КАНДАЛАКШСКОГО ЗАЛИВА БЕЛОГО МОРЯ В ПЕРИОД НЕРЕСТА

Р. У. Высоцкая¹, Е. А. Буэй¹, Д. Л. Лайус²

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН»,
Петрозаводск, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

Приведены результаты изучения активности лизосомальных ферментов в разных органах (печень, жабры, мышцы, гонады) половозрелых особей трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. в начале и конце нерестового периода. Рыбы для исследований были отловлены на трех нерестилищах в Кандалакшском заливе Белого моря, отличавшихся температурным режимом, соленостью, интенсивностью водообмена, водной растительностью и другими параметрами. В пробах определяли активность пяти кислых гидролаз (кислой фосфатазы, РНКазы, ДНКазы, β-галактозидазы, β-глюкуронидазы). Показано, что в течение нерестового периода рыбы находились в состоянии высокого метаболического напряжения, о чем свидетельствует повышение активности кислой фосфатазы и гликозидаз в печени и особенно – значительное возрастание уровня практически всех изученных ферментов в скелетной мускулатуре самцов и самок колюшки из всех биотопов к концу нерестового периода. Это позволяет сделать вывод о мощном воздействии эндогенных факторов (половых стероидных и других гормонов) на метаболизм рыб. Лизосомальные ферменты, осуществляя гидролиз внутриклеточных резервов и менее необходимых в данный момент компонентов, обеспечивают организм важными энергетическими и пластическими материалами. С участием ферментов лизосом происходит поступление веществ из внутренних органов в гонады для их созревания у рыб, позже подошедших на нерестилища, а также компенсируется недостаточное поступление экзогенных питательных веществ, особенно у самцов колюшки, занятых в конце нереста заботой о потомстве. Повышенный уровень активности кислых гидролаз в гонадах самок, видимо, связан с резорбцией невыметанной икры и регенерацией тканей гонад. В жабрах, в отличие от других органов, к концу нерестового периода отмечено угнетение активности гликозидаз и активация РНКазы даже на нерестилище с самыми благоприятными условиями (губа Сельдяная), что, скорее всего, объясняется резким изменением солености в данной акватории за время нереста. В целом реакция лизосомальных гидролаз на экологические флуктуации в разных биотопах была менее выражена по сравнению с влиянием эндогенных факторов, связанных с нерестом.

К л ю ч е в ы е с л о в а: трехиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* L.; кислые гидролазы; нерестовый период; условия среды; Белое море.

R. U. Vysotskaya, E. A. Buoy, D. L. Lajus. THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL ENZYMES IN ORGANS OF THREE SPINE STICKLEBACK FROM DIFFERENT HABITATS IN THE GULF OF KANDALAKSHA, WHITE SEA, DURING THE SPAWNING PERIOD

The results of studies on the activity of lysosomal enzymes in different organs (liver, gills, muscles, gonads) of mature threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. at the beginning and in the end of the spawning period are reported. Fish were captured from three spawning grounds in the Gulf of Kandalaksha, White Sea, which differed in temperature, salinity, retention time, aquatic vegetation and other parameters. The samples were analyzed for the activity of five acid hydrolases (acid phosphatase, RNase, DNase, β -galactosidase, β -glucuronidase). During the spawning period, fish were shown to be in a state of high metabolic stress, as evidenced by an increase in acid phosphatase and glycosidase activity in the liver and especially a significant increase in the level of almost all the studied enzymes in the skeletal muscles of stickleback males and females from all habitats by the end of spawning. We are thus driven to the conclusion about a powerful effect of endogenous factors (sex steroid and other hormones) on fish metabolism. As they hydrolyze intracellular reserves and the components which are less necessary at the moment, lysosomal enzymes provide the body with important energetic and constructive materials. Lysosomal enzymes take part in the transport of substances from internal organs to gonads to promote their maturation in the fish arriving at spawning grounds later, and help compensate the lack of exogenous nutrients, especially in stickleback males who care for the offspring in the end of the spawning period. The elevated activity of acid hydrolases in gonads of females is apparently associated with the resorption of unspawned eggs and regeneration of gonad tissues. Gills, unlike other organs, featured an inhibition of the activity of glycosidases and activation of RNase by the end of the spawning period even in the spawning ground with the most favorable conditions (Seldyanaya Bay), which is most likely due to a sharp change in salinity in this area over the spawning period. In general, the response of lysosomal hydrolases to environmental fluctuations in different habitats was less pronounced compared with the effect of endogenous factors associated with spawning.

Key words: stickleback *Gasterosteus aculeatus* L.; acid hydrolases; spawning period; environmental conditions; White Sea.

Введение

Колюшка трехиглая *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758 (Gasterosteidae) – небольшая, широко распространенная в бассейнах северной части Атлантического и Тихого океанов рыба [Аннотированный..., 1998]. Представители этого эвригалинного вида встречаются в морях, реках и озерах. По типу жизненного цикла принято различать морскую, проходную и пресноводную формы колюшки. Беломорская колюшка проводит всю жизнь в море, ведет стайный пелагический образ жизни, уходя для нагула и зимовки в открытое море, откуда возвращается большими косяками к прибрежным мелководьям на нерест в конце мая – начале июня [Ивантер, Рыжков, 2004]. Колюшка трехиглая относится к видам, для которых характерна забота о потомстве. Самец строит гнездо на дне, обычно в зарослях морской травы зостеры *Zostera marina*. Самки откладывают икру в гнезда и после нереста остаются на некоторое время на нерестилищах и активно пи-

таются [Демчук и др., 2018]. Самец после оплодотворения икринок меняет поведение на более агрессивное, защищает гнездо от других рыб, в основном от других самцов и самок своего вида, активно аэрирует кладку движениями плавников, убирает неоплодотворенные и погибшие икринки. Вылупившиеся через 1–2 недели личинки некоторое время остаются возле гнезда под охраной самца [Ивантер, Рыжков, 2004]. Подрастающая молодь колюшки обитает в зарослях зостеры до осени, затем откочевывает в открытое море [Rybkina et al., 2017]. Численность колюшки в Белом море подвержена значительным колебаниям [Лайус и др., 2013а]. В первой половине прошлого века были зафиксированы огромные стаи этой рыбы, затем ее численность резко снизилась, что связывают с гибелью в 60-е годы XX века травы зостеры [Бергер, 2007; Иванова, Лайус, 2008]. С конца 1990-х годов вслед за восстановлением зарослей зостеры наблюдается и возрастание обилия колюшки, численность которой к настоящему времени близка к историческому мак-

симуму [Лайус и др., 2013а; Bakhvalova et al., 2016]. Высказывается также предположение, что увеличение численности колюшки может быть связано с потеплением в регионе [Иванова, Лайус, 2008]. Установлено, что из больших заливов Белого моря максимальное количество колюшки (более 76 %) концентрируется в Кандалакшском заливе [Лайус и др., 2013б]. Промыслового значения трехиглая колюшка не имеет, однако, являясь в настоящий момент самым многочисленным видом в беломорском ихтиоценозе, она занимает ключевое положение в экосистемах моря [Ivanova et al., 2016]. Трехиглая колюшка – один из самых распространенных пищевых объектов для многих хищных рыб, среди которых такие важные промысловые виды, как сельдь *Clupea pallasii marisalbi*, треска *Gadus morhua*, навага *Eleginus nawaga*, и других рыб [Bakhvalova et al., 2016], а также некоторых видов птиц. Спектр питания самой колюшки довольно широк: от зоопланктона и бентоса до имаго насекомых, икры и молоди рыб, в том числе своего вида [Ивантер, Рыжков, 2004; Demchuk et al., 2015; Rybkina et al., 2016, Демчук и др., 2018]. Сказанным определяется роль трехиглой колюшки как связующего звена между разными трофическими уровнями в экосистемах разных заливов моря. Помимо этого, колюшка, совершающая миграции в разные районы моря, играет роль переносчика вещества и энергии из прибрежных экосистем в открытое море [Бергер, 2007].

В ходе жизненного цикла колюшка, как и другие водные организмы, испытывает влияние множества абиотических и биотических факторов (температура, освещенность, минеральный и газовый состав среды, характер грунтов и течений, наличие пищевых объектов, хищники и др.), к изменению которых организм вынужден постоянно приспосабливаться [Озернюк, 2003]. В адаптивных реакциях к воздействию экзогенных и эндогенных факторов важная роль принадлежит лизосомам – особым внутриклеточным органеллам, в которых сосредоточено более 70 гидролитических ферментов, активных в кислых условиях [Высоцкая, Немова, 2008]. Сведений о механизмах биохимических адаптаций трехиглой колюшки Белого моря к различным факторам в такой ответственный период, как размножение, определяющий состояние популяции важнейшего для беломорских экосистем вида, совершенно недостаточно [Лысенко и др., 2018; Мурзина и др., 2018; Чурова и др., 2018].

Учитывая сказанное, целью настоящей работы являлось исследование активности ли-

зосомальных ферментов в органах колюшки трехиглой *G. aculeatus* из разных биотопов Кандалакшского залива в период нереста.

Материалы и методы

В исследовании использовали половозрелых особей колюшки трехиглой *Gasterosteus aculeatus* L. обоего пола, отловленных в начале (29–30 мая 2016 г.) и конце (7–9 июля 2016 г.) нерестового периода. Рыбу отлавливали с помощью равнокрылого малькового невода длиной 7,5 м и высотой 1,5 м, который заводили в прибрежной полосе на расстояние 30 м от берега. Коэффициент уловистости невода принимали за 0,6 [Ivanova et al., 2016]. Отбор проб для исследований осуществляли на трех станциях, местоположение и ряд характеристик которых приведены в таблице 1.

Губа Сельдяная считается одним из наиболее продуктивных нерестилищ [Демчук и др., 2018; Доргам и др., 2018]. Она представляет собой залив треугольной формы с широким выходом и интенсивным водообменом. Вершина мелководная с небольшим пресноводным стоком, максимальная глубина составляет 8 м. Дно на литорали каменистое, на глубинах – илистое. В заливе очень густые заросли морской травы зостеры *Z. marina*.

Лагуна Колюшковая – это полузамкнутая акватория, связанная с морем через мелководный пролив, который временами может пересыхать. Максимальная глубина составляет 4 м. Водообмен с морем слабый. Площадь мелководий составляет до половины акватории. Хорошо прогревается летом, поэтому вода в лагуне, как правило, на 2 °С выше, чем в прилегающей морской акватории [Демчук и др., 2018]. Дно илистое, местами очень топкое. Зостеры несколько меньше, чем в Сельдяной губе, много нитчатых водорослей. Лагуна также весьма привлекательна для колюшки в качестве нерестилища.

Пролив Сухая Салма – типичный для Кандалакшского залива илисто-песчаный прибрежный биотоп. Это открытая акватория с интенсивными приливно-отливными течениями, из-за чего вода в проливе слабее прогревается, чем на первых двух нерестилищах. На литорали дно каменистое, глубже – песчаное. Водная растительность в проливе представлена фукоидами на каменистой литорали и разреженными зарослями зостеры в мелководной части. Численность колюшки, приходящей на это нерестилище, в несколько раз меньше, чем в Сельдяной губе и лагуне Колюшковой [Доргам и др., 2018].

Таблица 1. Характеристика мест отбора проб трехиглой колюшки *G. aculeatus* в Кандалакшском заливе Белого моря

Table 1. Characteristics of the sampling places of the threespine stickleback *G. aculeatus* in the Gulf of Kandalaksha of the White Sea

Географические координаты Geographical coordinates	Дата отбора проб Date of sampling	Температура, °С Temperature, °C	Соленость, ‰ Salinity, ‰
Пролив Сухая Салма Sukhaya Salma Strait 66°31'16.96"N, 33°64'73.70"E	28.05.2016	12	16
	08.07.2016	20	19
Сельдяная губа Seldyanaya Inlet 66°33'80.66"N, 33°62'25.16"E	29.05.2016	15	12
	07.07.2016	20	24
Колюшковая лагуна Kolyushkovaya Lagoon 66°31'32.62"N, 33°64'59.53"E	30.05.2016	16	15
	09.07.2016	22	20

Рыбы, взятые для исследований на разных нерестилищах, между собой не различались по размерно-массовым характеристикам. Достоверные отличия отмечены между самцами и самками, а также между рыбами на разных этапах нерестового периода. В среднем для анализов были взяты перед нерестом самцы массой $2,87 \pm 0,12$ г и длиной $5,96 \pm 0,12$ см, самки массой $3,83 \pm 0,35$ г и длиной $6,27 \pm 0,09$ см. После нереста эти показатели у самцов составляли $2,5 \pm 0,11$ г и $5,83 \pm 0,09$ см, у самок – $3,17 \pm 0,18$ г и $6,33 \pm 0,18$ см соответственно. Уменьшение массы рыб после нереста связано с выметыванием половых продуктов и высокими энергетическими затратами в нерестовый период [Доргам и др., 2018].

Проведение аналитических работ осуществляли с использованием приборов ЦКП Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук». Для биохимического анализа использовали печень, жабры, мышцы и гонады самок рыб. Навески тканей гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы, содержащем 0,001 М ЭДТА и 0,1 % неионного детергента тритона X-100, разрушающего внутриклеточные мембраны и высвобождающего содержащиеся в лизосомах ферменты. Гомогенаты осветляли центрифугированием при 10 000 g на центрифуге с охлаждением Allegra 64R (Beckman Coulter, США). В надосадочной жидкости определяли активность 5 ферментов (кислой фосфатазы, ДНКазы, РНКазы, β -галактозидазы, β -глюкуронидазы) и содержание белка.

Активность кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2) определяли по методу Баррета и Хита [1980], используя в качестве субстрата β -глицерофосфат натрия на ацетатном бу-

фере, pH 4,8. Активность фермента выражали в микрограммах неорганического фосфора (P_{in}), образующегося в результате реакции, количество которого рассчитывали после реакции с хромогенным реактивом [Kahovcova, Odavic, 1969].

Активность кислых нуклеаз – ДНКазы (КФ 3.1.4.6) и РНКазы (КФ 3.1.4.23) – определяли методами Покровского, Арчакова [1968] и Левицкого с соавторами [1973] соответственно. Субстратами служили 0,1%-е растворы дезоксирибонуклеиновой кислоты (pH 5) и рибонуклеиновой кислоты (pH 5,2) в ацетатном буфере. Количество низкомолекулярных фрагментов нуклеиновых кислот, образующихся при их гидролизе нуклеазами, определяли спектрофотометрически при 260 нм. Активность ферментов выражали в условных единицах ΔD_{260} .

Активность β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23) и β -глюкуронидазы (КФ 3.2.1.31) определяли методами, предложенными Барретом и Хитом [1980]. В качестве субстратов использовали *пара*-нитрофенил- β , D-галактопиранозид (pH 4) и *пара*-нитрофенил- β , D-глюкуронид (pH 5) в цитратном буфере соответственно. Активность гликозидаз выражали в микромолях *пара*-нитрофенола, образующегося в ходе реакции. Расчет проводили на мг белка, содержание которого в пробах определяли по методу Лоури.

Полученные данные обработаны общепринятыми методами вариационной статистики и представлены в виде средних значений и их ошибок. Сравнение биохимических показателей в группах исследованных рыб проводили с применением непараметрического критерия U Вилкоксона – Манна – Уитни [Гублер, Генкин, 1969]. Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$.

Таблица 2. Активность лизосомальных ферментов в печени колюшки трехиглой *G. aculeatus* из разных биотопов в период нереста (n=5–7)

Table 2. The activity of lysosomal enzymes in the liver of the threespine stickleback *G. aculeatus* from different biotopes during the spawning period (n=5–7)

Стадия нерестового периода Spawning period stage	Сухая Салма Sukhaya Salma Strait		Сельдяная губа Seldyanaya Inlet		Колюшковая лагуна Kolyushkovaya Lagoon	
	Самцы Males	Самки Females	Самцы Males	Самки Females	Самцы Males	Самки Females
Кислая фосфатаза, мкг P _{in} /мг белка Acid phosphatases, μg P _{in} /mg protein						
Начало Beginning	7,47 ± 1,45 ^{6b}	11,38 ± 1,46	14,55 ± 0,64	10,95 ± 0,76	11,81 ± 0,59 ⁶	8,81 ± 0,89
Конец End	12,07 ± 0,86 ^{ab}	13,18 ± 0,94 ^b	8,49 ± 1,30 ^a	11,64 ± 1,20 ^b	19,16 ± 0,81 ^{a6}	21,16 ± 4,31 ^a
РНКаза, Δ D ₂₆₀ /мг белка RNase, Δ D ₂₆₀ /mg protein						
Начало Beginning	0,952 ± 0,05 ⁵	0,563 ± 0,04	0,692 ± 0,10	0,510 ± 0,04	1,082 ± 0,06	0,546 ± 0,06
Конец End	0,572 ± 0,02 ^{a6b}	0,640 ± 0,05	0,828 ± 0,07	0,700 ± 0,04 ^a	0,890 ± 0,07	0,748 ± 0,14
ДНКаза, Δ D ₂₆₀ /мг белка DNase, Δ D ₂₆₀ /mg protein						
Начало Beginning	0,276 ± 0,01 ^b	0,363 ± 0,03	0,320 ± 0,03	0,375 ± 0,05	0,314 ± 0,01	0,213 ± 0,02 ⁶
Конец End	0,278 ± 0,00 ^b	0,247 ± 0,02 ^a	0,280 ± 0,02	0,280 ± 0,01 ^a	0,318 ± 0,02	0,295 ± 0,03 ^a
В-галактозидаза, мкмоль пара-нитрофенола / мг белка B-galactosidase, μMol para-nitrophenol / mg protein						
Начало Beginning	0,104 ± 0,004 ^a	0,072 ± 0,007 ^{6b}	0,15 ± 0,01	0,054 ± 0,004	0,132 ± 0,008	0,044 ± 0,004
Конец End	0,145 ± 0,002 ^{a6b}	0,119 ± 0,01 ^{a6}	0,128 ± 0,01	0,094 ± 0,012	0,14 ± 0,01	0,154 ± 0,03 ^{a6}
В-глюкуронидаза, мкмоль пара-нитрофенола / мг белка B-glucuronidase, μMol para-nitrophenol / mg protein						
Начало Beginning	0,339 ± 0,01 ^{6b}	0,15 ± 0,02 ⁶	0,434 ± 0,03	0,096 ± 0,006	0,242 ± 0,034	0,116 ± 0,016
Конец End	0,512 ± 0,01 ^{a6b}	0,35 ± 0,07 ^a	0,360 ± 0,02	0,306 ± 0,018 ^a	0,356 ± 0,004 ^a	0,306 ± 0,054 ^a

Примечание. Здесь и далее: ^a – различия достоверны между рыбами того же пола в начале и конце нереста, ⁶ – различия достоверны по сравнению с рыбами из Сельдяной губы, ^b – различия достоверны по сравнению с рыбами из Колюшковой лагуны.

Note. Here and hereinafter: ^a – the differences are significant between fish of the same sex at the beginning and end of spawning, ⁶ – the differences are significant in comparison with the fish from Seldyanaya Inlet, ^b – the differences are significant in comparison with the fish from Kolyushkovaya Lagoon.

Результаты

Исследования показали значительные различия в активности изученных ферментов у самцов и самок колюшки на разных этапах нерестового периода и из разных биотопов. При этом отмечено как повышение, так и снижение активности отдельных ферментов. Так, в печени к концу нереста происходило повышение активности кислой фосфатазы, β-галактозидазы и практически во всех сравниваемых вариантах – β-глюкуронидазы (табл. 2). Достоверно снижалась активность ДНКазы в печени отнерестившихся самок из Сельдяной губы.

В печени самок из Колюшковой лагуны в конце нерестового периода активность всех изученных ферментов была более высокой, чем в его начале. В жабрах рыб, напротив, к концу нереста отмечено снижение активности кислой фосфатазы, ДНКазы и обеих гликозидаз (табл. 3).

При сравнении особей из разных биотопов можно отметить угнетение РНКазы у рыб из Сухой Салмы, в отличие от аналогичных показателей у рыб из Сельдяной губы и Колюшковой лагуны. На этом фоне выделяется значительно более высокий уровень активности β-глюкуронидазы в жабрах отнерестившихся самцов из Колюшковой лагуны.

Таблица 3. Активность лизосомальных ферментов в жабрах колюшки трехиглой *G. aculeatus* из разных биотопов в период нереста (n=5–7)

Table 3. The activity of lysosomal enzymes in the gills of the threespine stickleback *G. aculeatus* from different biotopes during the spawning period (n=5–7)

Стадия нерестового периода Spawning stage	Сухая Салма Sukhaya Salma Strait		Сельдяная губа Seldyanaya Inlet		Колюшковая лагуна Kolyushkovaya Lagoon	
	Самцы Males	Самки Females	Самцы Males	Самки Females	Самцы Males	Самки Females
Кислая фосфатаза, мкг P _{in} /мг белка Acid phosphatases, μg P _{in} /mg protein						
Начало Beginning	5,86 ± 0,73	4,99 ± 0,01 ^{6b}	7,46 ± 0,32	8,79 ± 0,90 ^b	5,31 ± 0,11	6,09 ± 0,17
Конец End	4,85 ± 0,29 ⁶	3,83 ± 0,54 ^a	3,59 ± 0,59 ^a	3,84 ± 0,60 ^a	5,06 ± 0,43	3,59 ± 0,57 ^a
РНКаза, Δ D ₂₆₀ /мг белка RNase, Δ D ₂₆₀ /mg protein						
Начало Beginning	0,360 ± 0,04 ^a	0,348 ± 0,009	0,468 ± 0,05	0,478 ± 0,07	0,645 ± 0,08	0,346 ± 0,003
Конец End	0,367 ± 0,03 ^{6b}	0,340 ± 0,04 ⁶	0,735 ± 0,12	0,607 ± 0,07	0,720 ± 0,08	0,514 ± 0,07
ДНКаза, Δ D ₂₆₀ /мг белка DNase, Δ D ₂₆₀ /mg protein						
Начало Beginning	0,378 ± 0,02 ⁶	0,338 ± 0,003 ^{6b}	0,593 ± 0,04	0,690 ± 0,08 ^b	0,360 ± 0,03	0,272 ± 0,01
Конец End	0,262 ± 0,03 ^a	0,216 ± 0,003 ^a	0,268 ± 0,01 ^a	0,293 ± 0,04 ^a	0,428 ± 0,08	0,216 ± 0,04
В-галактозидаза, мкМоль пара-нитрофенола / мг белка B-galactosidase, μMol para-nitrophenol / mg protein						
Начало Beginning	0,089 ± 0,005	0,076 ± 0,002 ⁶	0,118 ± 0,012	0,098 ± 0,006 ^b	0,086 ± 0,006	0,068 ± 0,004
Конец End	0,078 ± 0,010	0,066 ± 0,003	0,062 ± 0,010 ^a	0,060 ± 0,012 ^a	0,068 ± 0,002 ^a	0,100 ± 0,014
В-глюкуронидаза, мкМоль пара-нитрофенола / мг белка B-glucuronidase, μMol para-nitrophenol / mg protein						
Начало Beginning	0,136 ± 0,008 ^{6b}	0,144 ± 0,008 ⁶	0,214 ± 0,012	0,256 ± 0,01 ^b	0,224 ± 0,014	0,114 ± 0,016
Конец End	0,150 ± 0,01 ^{6b}	0,142 ± 0,022	0,126 ± 0,002 ^a	0,148 ± 0,014 ^a	0,584 ± 0,06 ^a	0,118 ± 0,018

Наиболее значимыми были изменения активности лизосомальных ферментов в скелетных мышцах рыб. При этом к концу нерестового периода активность практически всех кислых гидролаз значительно превышала уровень этих ферментов в начале нереста (табл. 4). Особенно заметно возрастал уровень активности РНКазы у самцов и самок колюшки из Колюшковой лагуны и Сельдяной губы.

В гонадах самок колюшки в ходе нереста отмечено снижение активности кислой фосфатазы и достоверное повышение активности β-глюкуронидазы у рыб из всех биотопов (табл. 5).

Обсуждение

Все этапы жизненного цикла рыб происходят под влиянием комплекса внешних и внутренних факторов. Сезонные циклы роста,

размножения, миграций тесно связаны с воздействием таких факторов, как температура, освещенность, продолжительность светового дня, соленость и другие. Под их влиянием через посредство нейрогуморальной и эндокринной систем включаются механизмы, вызывающие изменения морфологических признаков, физиолого-биохимических показателей и поведенческих реакций [Аминева, Яржомбек, 1984]. Под влиянием гормонов в нерестовый период у самцов колюшки трехиглой изменяется окраска тела: их брюшко становится красным, а глаза голубыми, при этом самки сохраняют серовато-зеленоватую окраску [Лайус и др., 2013а]. При исследованиях, выполненных на колюшке, взятой на тех же нерестилищах и одновременно с нашими пробами, было продемонстрировано, что конкуренция за гнездовые территории в нерестовый период, трата энергоресурсов, миграции приводят к слож-

Таблица 4. Активность лизосомальных ферментов в скелетных мышцах колюшки трехиглой *G. aculeatus* из разных биотопов в период нереста (n=5–7)

Table 4. The activity of lysosomal enzymes in skeletal muscle of the threespine stickleback *G. aculeatus* from different biotopes during the spawning period (n=5–7)

Стадия нерестового периода Spawning stage	Сухая Салма Sukhaya Salma Strait		Сельдяная губа Seldyanaya Inlet		Колюшковая лагуна Kolyushkovaya Lagoon	
	Самцы Males	Самки Females	Самцы Males	Самки Females	Самцы Males	Самки Females
Кислая фосфатаза, мкг P _{in} /мг белка Acid phosphatases, μg P _{in} /mg protein						
Начало Beginning	5,01 ± 0,29	5,25 ± 1,12	5,90 ± 0,75	7,59 ± 0,27	4,66 ± 0,30	5,02 ± 0,22 ^б
Конец End	8,41 ± 1,48 ^а	7,66 ± 1,23	7,16 ± 0,41	6,20 ± 0,50 ^а	5,49 ± 0,62 ^б	8,21 ± 0,55 ^{а^б}
РНКаза, Δ D ₂₆₀ /мг белка RNase, Δ D ₂₆₀ /mg protein						
Начало Beginning	0,634 ± 0,04 ^{б^а}	0,557 ± 0,06 ^{б^б}	0,270 ± 0,04	0,317 ± 0,01	0,107 ± 0,01	0,518 ± 0,02 ^б
Конец End	0,620 ± 0,08	0,854 ± 0,12 ^{а^б}	0,720 ± 0,05 ^а	0,596 ± 0,11 ^а	0,901 ± 0,12 ^а	1,294 ± 0,14 ^{а^б}
ДНКаза, Δ D ₂₆₀ /мг белка DNase, Δ D ₂₆₀ /mg protein						
Начало Beginning	0,341 ± 0,03	0,418 ± 0,07 ^б	0,404 ± 0,05	0,686 ± 0,07	0,307 ± 0,02	0,353 ± 0,02 ^б
Конец End	0,405 ± 0,04	0,478 ± 0,06	0,536 ± 0,05 ^а	0,427 ± 0,05 ^а	0,421 ± 0,04 ^а	0,474 ± 0,03 ^а
В-галактозидаза, мкМоль пара-нитрофенола / мг белка B-galactosidase, μMol para-nitrophenol / mg protein						
Начало Beginning	0,022 ± 0,002	0,024 ± 0,004	0,034 ± 0,006	0,032 ± 0,01	0,018 ± 0,002	0,022 ± 0,002
Конец End	0,030 ± 0,004	0,046 ± 0,008 ^а	0,046 ± 0,008	0,032 ± 0,01	0,034 ± 0,006 ^а	0,06 ± 0,002 ^{а^б}
В-глюкуронидаза, мкМоль пара-нитрофенола / мг белка B-glucuronidase, μMol para-nitrophenol / mg protein						
Начало Beginning	0,020 ± 0,002	0,033 ± 0,004	0,030 ± 0,006	0,040 ± 0,004	0,020 ± 0,002	0,040 ± 0,002
Конец End	0,045 ± 0,006 ^а	0,079 ± 0,01 ^{а^б}	0,052 ± 0,004 ^а	0,040 ± 0,006	0,036 ± 0,004 ^{а^б}	0,050 ± 0,004

ной картине изменчивости морфологических признаков рыб на разных этапах нереста [Доргам и др., 2018]. Нерестовый период сопровождается также серьезными преобразованиями внутриклеточного метаболизма. Выявленные в нашем исследовании значительные изменения активности кислых гидролаз свидетельствуют об активном участии лизосом в этих преобразованиях. В конце нерестового периода в печени колюшки отмечен высокий уровень активности фермента-маркера лизосом – кислой фосфатазы. Это позволяет говорить об интенсивном синтезе лизосомальных гидролаз, которые направляются в другие органы и осуществляют реакции, связанные с обеспечением организма необходимыми ему в данный момент пластическими и энергетическими материалами, а также веществами, участвующими в регуляции метаболизма и поддержании гомеостаза. В частности, к концу нерестового периода

в печени самцов и самок достоверно возрастает уровень β-галактозидазы – фермента, участвующего в метаболизме галактозосодержащих гликолипидов и гликопротеинов, осуществляющих регуляцию многих путей обмена, процессов межклеточного взаимодействия, клеточной дифференцировки, рецепторную и другие важные функции [Winchester, 2005].

Ранее нами было показано активное участие лизосомальных ферментов в формировании ооцитов и спермиев рыб, главным образом за счет питательных веществ, поступающих из внутренних органов [Высоцкая, Немова, 2008]. Лизосомы играют важную роль в подготовке ооцитов к оплодотворению и в самом процессе слияния гамет [Stinchcombe et al., 2004], так же как и в многочисленных морфогенетических преобразованиях, которые запускаются в яйцеклетке сразу после оплодотворения [Немова, 1996].

Таблица 5. Активность лизосомальных ферментов в гонадах самок колюшки трехиглой *G. aculeatus* из разных биотопов в период нереста (n=5)

Table 5. The activity of lysosomal enzymes in gonads of stickleback females *G. aculeatus* from different biotopes during the spawning period (n=5)

Стадия нерестового периода Spawning stage	Сухая Салма Sukhaya Salma Strait	Сельдяная губа Seldyanaya Inlet	Колюшковая лагуна Kolyushkovaya Lagoon
Кислая фосфатаза, мкг P _{in} /мг белка Acid phosphatases, μg P _{in} /mg protein			
Начало Beginning	5,77 ± 0,48 ^{6b}	4,14 ± 0,32 ^a	11,89 ± 2,15
Конец End	2,99 ± 0,91 ^{a6}	4,67 ± 0,83	3,71 ± 0,44 ^a
РНКаза, Δ D ₂₆₀ /мг белка RNase, Δ D ₂₆₀ /mg protein			
Начало Beginning	0,148 ± 0,04 ⁶	0,381 ± 0,09	0,242 ± 0,06
Конец End	0,202 ± 0,03 ^a	0,459 ± 0,16	0,352 ± 0,06
ДНКаза, Δ D ₂₆₀ /мг белка DNase, Δ D ₂₆₀ /mg protein			
Начало Beginning	0,075 ± 0,005 ⁶	0,147 ± 0,03	0,098 ± 0,01
Конец End	0,111 ± 0,01 ^a	0,150 ± 0,02	0,110 ± 0,04
В-галактозидаза, мкМоль пара-нитрофенола / мг белка B-galactosidase, μMol para-nitrophenol / mg protein			
Начало Beginning	0,024 ± 0,002 ^{6a}	0,038 ± 0,006 ^a	0,058 ± 0,008
Конец End	0,030 ± 0,002 ^a	0,038 ± 0,006	0,034 ± 0,004 ^a
В-глюкуронидаза, мкМоль пара-нитрофенола / мг белка B-glucuronidase, μMol para-nitrophenol / mg protein			
Начало Beginning	0,018 ± 0,001	0,018 ± 0,002	0,018 ± 0,002
Конец End	0,052 ± 0,022 ^a	0,068 ± 0,012 ^a	0,060 ± 0,012 ^a

На более высоком уровне к концу нерестового периода была активность и другой гликозидазы – β-глюкуронидазы. Этот фермент участвует в распаде мукополисахаридов, являющихся важнейшими компонентами соединительной ткани. Фермент может участвовать в резорбции невыметанных половых продуктов, а также в инволюции тканей гонад после нереста. Участием в этих процессах, на наш взгляд, объясняется высокая активность данного фермента, а также нуклеаз в гонадах отнерестившихся самок. Следует отметить, что β-глюкуронидаза, как и другие гликозидазы, кроме реакций гидролиза может катализировать реакции трансгликозилирования, то есть осуществлять перенос остатка глюкуроновой кислоты на другие вещества. В результате данной реакции образуются растворимые конъюгаты и тем самым достигается обезвреживание и выведение из организма многих ксенобиоти-

ков и эндогенных метаболитов. По такому механизму может обезвреживаться, например, избыток катехоламинов (адреналина и норадреналина), повышенный уровень которых можно предположить у колюшки в нерестовый период. В пользу этого свидетельствует агрессивное поведение самцов в борьбе за нерестовые участки, при охране кладки и защите подрастающей молоди.

К концу нерестового периода отмечен высокий уровень активности практически всех лизосомальных ферментов в скелетных мышцах как самцов, так и самок колюшки. Особенно заметным было повышение активности РНКазы и β-глюкуронидазы у рыб на нерестилищах с благоприятными условиями – в Колюшковой лагуне и Сельдяной губе. Наблюдаемое явление может быть объяснено двумя причинами. Во-первых, рыбы подходят на нерест не одновременно. В разгар нереста на нерестилищах

встречались самки, имеющие III стадию зрелости гонад [Лайус и др., 2013б]. Процесс созревания гонад у таких рыб происходил уже на нерестилищах, и такие особи могли оказаться в пробах, взятых на анализ. Как отмечалось выше, при гаметогенезе происходит активная перекачка веществ в гонады из внутренних органов, расщепление резервных компонентов в которых осуществляется лизосомальными ферментами. Во-вторых, во время нереста колюшка менее интенсивно питается, особенно это относится к самцам, которые не могут далеко и надолго отлучаться от гнезда [Демчук и др., 2018]. Энергозатраты во время нереста и в конце нерестового периода значительно возрастают. Было показано, что по окончании нерестового периода у представителей обоих полов колюшки упитанность снижалась, при этом в большей мере у самцов, чем у самок [Демчук и др., 2018]. Недостаточное поступление экзогенных питательных веществ в этой ситуации компенсируется за счет перехода организма на эндогенное питание, в котором основную роль играют лизосомальные ферменты. Подтверждением данного предположения и является установленная в нашем исследовании значительная активизация лизосомальных гидролаз к концу нерестового периода в мышцах самцов из всех биотопов. Последнее обстоятельство свидетельствует об использовании компонентов скелетной мускулатуры в качестве строительного и энергетического материала. Все процессы, происходящие в этот период в организме рыб, находятся под контролем и регулирующим влиянием нейроэндокринной системы. К концу нерестового периода у самцов колюшки трехиглой отмечено снижение уровня андрогенов в плазме крови, происходят изменения в половом поведении: охрана территории и ухаживание за самкой сменяется стадией заботы о потомстве [Рендаков, 2018].

Картина изменения активности лизосомальных гидролаз в ходе нерестового периода в жабрах заметно отличается от таковой в других органах. Снижение активности большинства изученных ферментов (кроме РНКазы) в жабрах в конце нерестового периода во всех биотопах можно связать с повышением солености за этот период. Отметим, что наиболее значительным было изменение солености в самой благоприятной для нереста колюшки акватории – Сельдяной губе (с 12 до 24 ‰). Ранее в исследованиях на моллюсках нами была показана высокая чувствительность нуклеаз к распреснению воды: при снижении солености наблюдалось угнетение их активности [Амелина, 2006]. Активность же гликозидаз, напротив,

угнеталась при более высокой солености [Высоцкая и др., 2005]. Аналогичный результат получен и в данном исследовании на рыбах. При этом наиболее заметные изменения отмечены в жабрах – органе, который первым реагирует на изменения в химическом составе водной среды.

Заключение

Результаты проведенных исследований показали, что в течение нерестового периода в органах трехиглой колюшки происходят существенные органоспецифичные изменения в активности лизосомальных гидролаз, связанные как с адаптациями рыб к меняющимся условиям среды, так и с переменной физиологического состояния самцов и самок, происходящей под влиянием половых стероидов и других гормонов.

Возрастание активности кислой фосфатазы, РНКазы и гликозидаз в печени и особенно в скелетной мускулатуре у рыб из биотопов с благоприятными и менее благоприятными условиями для нереста позволяют сделать вывод о мощном воздействии эндогенных факторов на метаболические преобразования в организме в этот период. Лизосомальные ферменты, осуществляя гидролиз внутриклеточных резервов и менее необходимых в данный момент компонентов, участвуют в обеспечении организма энергетическими и пластическими материалами для поддержания основных процессов жизнедеятельности. При участии лизосомальных гидролаз за счет компонентов внутренних органов происходит созревание гонад у позже подошедших на нерестилища рыб, а также компенсируется недостаточное поступление экзогенных питательных веществ, то есть происходит переключение на эндогенное питание, в котором основную роль играют ферменты лизосом. В конце нерестового периода в гонадах самок колюшки отмечено повышение уровня β -глюкуронидазы и нуклеаз, что можно связать с резорбцией невыметанной икры и инволюцией тканей гонад. Несколько выделяются данные по изменению активности изученных ферментов в жабрах рыб, выловленных на разных нерестилищах. К концу нерестового периода в этом органе, ответственном за осморегуляцию и поддержание кислотно-щелочного баланса, в акваториях, где происходило значительное повышение солености, наблюдалось угнетение активности гликозидаз и активация РНКазы.

В целом можно сделать вывод, что под влиянием комплекса факторов в органах трехиглой

колюшки в течение нерестового периода происходили адаптивные перестройки в активности лизосомального аппарата во всех органах. При этом реакция лизосомальных гидролаз на экологические флуктуации в разных акваториях в этот период была менее выраженной по сравнению с влиянием эндогенных факторов, связанных с нерестом.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0076).

Литература

Амелина В. С. Кислые нуклеазы и их роль в приспособительных реакциях водных организмов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2006. 26 с.

Аmineва В. А., Яржомбек А. А. Физиология рыб. М.: Легкая и пищ. пром-сть, 1984. 200 с.

Аннотированный каталог круглоротых и рыб континентальных вод России / Ред. Ю. С. Решетников. М.: Наука, 1998. 220 с.

Баррет А. Дж., Хит М. Ф. Лизосомальные ферменты // Лизосомы. Методы исследования. М.: Мир, 1980. С. 25–56.

Бергер В. Я. Продукционный потенциал Белого моря. Исследования фауны морей. Т. 60(68). СПб.: ЗИН РАН, 2007. 292 с.

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

Высоцкая Р. У., Ломаева Т. А., Такшеев С. А., Амелина В. С., Бахмет И. Н. Активность лизосомальных и некоторых других ферментов в тканях мидий при разном уровне солености // Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря: Материалы IX междунар. конф. (11–14 октября 2004 г., Петрозаводск). Петрозаводск: ПИН, 2005. С. 72–75.

Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина, 1969. 29 с.

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

Доргам А. С., Головин П. В., Иванова Т. С., Иванов М. В., Савельев П. Д., Лайус Д. Л. Гетерогенность морфологических признаков трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* на разных этапах нереста // Труды КарНЦ РАН. 2018. № 4. С. 59–73. doi: 10.17076/them819

Иванова Т. С., Лайус Д. Л. Временная и пространственная изменчивость численности трехиглой колюшки в районе Керетского архипелага Кандакшского залива Белого моря // Мат-лы науч. конф., посв. 70-летию Беломорской биологической станции МГУ: Сб. ст. М.: Гриф и К, 2008. С. 267–270.

Ивантер Д. Э., Рыжков Л. П. Рыбы. Петрозаводск: ПетрГУ, 2004. 176 с.

Лайус Д. Л., Иванов М. В., Иванова Т. С., Шатских Е. В. «Волны жизни» беломорской колюшки // Природа. 2013а. № 4. С. 43–52.

Лайус Д. Л., Иванов М. В., Иванова Т. С., Шатских Е. В. Сколько сейчас колюшки в Белом море? // Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря: XII Междунар. конф. с элементами школы для молодых ученых и аспирантов: Сб. материалов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2013б. С. 185–188.

Левицкий А. П., Барабаш Р. Д., Коновец В. М. Сезонные особенности активности рибонуклеазы и α -амилазы слюны и слюнных желез у крыс линии Вистар // Биохимическая эволюция. Л.: Наука, 1973. С. 192–195.

Лысенко Л. А., Канцерова Н. П., Тушина Е. Д., Полякова Н. В., Лайус Д. Л., Немова Н. Н. Разнокачественность трехиглой колюшки (*Gasterosteus aculeatus*) Белого моря в начале нереста по активности кальцийзависимых протеиназ и популяционным характеристикам // Труды КарНЦ РАН. 2018. № 5. С. 79–88. doi: 10.17076/eco700

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, *Gastrosteidae*) с разных нерестилищ в Белом море // Известия РАН. Сер. биол. 2018. № 6. С. 593–602. doi: 10.1134/S0002332918060085

Немова Н. Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 1996. 104 с.

Озернюк Н. Д. Феноменология и механизмы адаптационных процессов. М.: МГУ, 2003. 215 с.

Покровский А. А., Арчаков А. И. Методы разделения и ферментной идентификации субклеточных фракций // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1968. С. 5–59.

Рендаков Н. Л. Некоторые аспекты стероидной регуляции у костистых рыб // Труды КарНЦ РАН. 2018. № 6. С. 3–21. doi: 10.17076/eb777

Чурова М. В., Шульгина Н. С., Немова Н. Н. Активность ферментов энергетического и углеводного обмена в органах колюшки *Gasterosteus aculeatus* из разных биотопов Белого моря в период нереста // ДАН. 2018. Т. 482, № 1. С. 111–113. doi: 10.31857/S086956520003148-5

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(3). P. 317–334.

Demchuk A. S., Ivanov M. V., Ivanova T. S., Polaykova N. V., Mas-Marti E., Lajus D. L. Feeding patterns in seagrass beds of three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* juveniles at different growth stages // *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 2015. Vol. 95(8). P. 1635–1643. doi: 10.1017/S0025315415000569

Ivanova T. S., Ivanov M. V., Golovin P. V., Polyakova N. V., Lajus D. L. The White Sea threespine stickleback population: spawning habitats, mortality, abundance // *Evol. Ecol. Res.* 2016. Vol. 17(3). P. 301–305.

Kahovcova J., Odavic R. A simple method of the quantitative analysis of phospholipids separated by thin layer chromatography // *J. Chromatogr.* 1969. Vol. 40. P. 90–96.

Rybkina E. V., Demchuk A. S., Lajus D. L., Ivanova T. S., Ivanov M. V., Galaktionov K. V. Dynamics of parasite community during early ontogenesis of marine threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus* // *Evol. Ecol. Res.* 2016. Vol. 17(3). P. 335–354. URL: <http://evolutionaryecology> (дата обращения: 10.10.2018).

References

Amelina V. S. Kislye nukleazy i ikh rol' v prisposobitel'nykh reaktsiyakh vodnykh organizmov [Acid nucleases and their role in adaptive reactions of aquatic organisms]: Summary of PhD (Cand. of Biol.) thesis. Petrozavodsk, 2006. 26 p.

Amineva V. A., Yarzhombek A. A. Fiziologiya ryb [Fish physiology]. Moscow: Light and food industry, 1984. 200 p.

Annotirovannyi katalog kruglorotykh i ryb kontinental'nykh vod Rossii [Annotated check-list of the cyclostomes and fishes of the continental waters of Russia]. Ed. Yu. S. Reshetnikov. Moscow: Nauka, 1998. 220 p.

Barrett A. J., Heat M. F. Lizosomal'nye fermenty [Lysosomal enzymes]. *Lyzosomy. Metody issled.* [Lysosomes: a laboratory handbook]. Ed. J. T. Dingle. Amsterdam; New York; Oxford: North-Holland Publishing Company, 1977. Moscow: Mir, 1980. P. 25–156.

Berger V. Ya. Produktsionnyi potentsial Belogo morya. Issledovaniya fauny morei [Production potential of the White Sea. Study of marine fauna]. Vol. 60(68). St. Petersburg: ZIN RAN, 2007. 292 p.

Churova M., Shul'gina N., Nemova N. Aktivnost' fermentov energeticheskogo i uglevodnogo obmena v organakh kolyushki *Gasterosteus aculeatus* iz raznykh biotopov Belogo morya v period neresta [The activity of enzymes of energy and carbohydrate metabolism in the organs of stickleback *Gasterosteus aculeatus* from different biotopes of the White Sea during the spawning period]. *DAN* [Proceed. RAS]. 2018. Vol. 482, no. 1. P. 111–113. doi: 10.31857/S086956520003148-5

Demchuk A. S., Ivanov M. V., Ivanova T. S., Polyakova N. V., Golovin P. V., Lajus D. L. Pitanie belomorskoj trekhigloi kolyushki *Gasterosteus aculeatus* (Linnaeus, 1758) na nerestilishchakh [Feeding of the threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Linnaeus, 1758) at the spawning grounds]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2018. No. 4. P. 42–58. doi: 10.17076/them818

Dorgham A. S., Golovin P. V., Ivanova T. S., Ivanov M. V., Savel'ev P. D., Lajus D. L. Geterogenost' morfologicheskikh priznakov trekhigloi kolyushki *Gasterosteus aculeatus* na raznykh etapakh neresta [Morphological variation of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) on different stages of the spawning period]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2018. No. 4. P. 59–73. doi: 10.17076/them819

Rybkina E. V., Ivanova T. S., Ivanov M. V., Kucheryavyy A. V., Lajus D. L. Habitat preference of three-spined stickleback juveniles in experimental conditions and in wild eelgrass // *J. Mar. Biol. Ass. UK.* 2017. Vol. 97(7). P. 1437–1445. doi: 10.1017/S0025315416000825

Stinchcombe J., Bossi G., Griffiths G. M. Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes // *Science.* 2004. Vol. 305. P. 55–59. doi: 10.1126/science.1095291

Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins // *Glycobiol.* 2005. Vol. 15, no. 6. P. 1R–15R. doi:10.1093/glycob/cwi041

Поступила в редакцию 17.10.2018

Gubler E. V., Genkin A. A. Primenenie kriteriev neparаметricheskoi statistiki dlya otsenki razlichii grupp nablyudenii v medico-biologicheskikh issledovaniyakh [Application of criteria of nonparametric statistics for estimating differences between two study groups in biomedical research]. Moscow: Meditsina, 1969. 29 p.

Ivanter D. E., Ryzhkov L. P. Ryby [Fish]. Petrozavodsk: PetrSU, 2004. 176 p.

Ivanova T. S., Lajus D. L. Vremennaya i prostranstvennaya izmenchivost' chislennosti trekhigloi kolyushki v raione Keretskogo arhipelaga Kandalakshskogo zaliva Belogo morya [Time and spatial variability of the Keret Archipelago of the Gulf of Kandalaksha in the White Sea]. *Mat. nauch. konf., posv. 70-let. Belomorskoj biol. stantsii MGU* [Proceed. sci. conf. dedicated to the 70th anniv. of the Belomorsk biol. station of the Moscow St. Univ.]. Moscow: Grif i K, 2008. P. 267–270.

Lajus 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]. 2013a. Vol. 4. P. 43–52.

Lajus D. L., Ivanova T. S., Ivanov M. V., Shatskikh E. V. Skol'ko seichas kolyushki v Belom more? [How many sticklebacks are there in the White Sea now?]. *Probl. izuch., rats. ispolz. i okhrany prir. res. Belogo morya: XIII Mezhd. konf. s elem. shkoly dlya molodykh uch. i asp.* (Petrozavodsk, 2013) [Iss. of studying, rational use, and protection of nat. res. of the White Sea: abs. XIII int. conf.-school for young scientists and graduate students. Coll. papers (Petrozavodsk, 2013)]. Petrozavodsk: KarRC RAS, 2013b. P. 185–188.

Levitskii A. P., Barabash R. D., Konovets V. M. Sezonnnye osobennosti aktivnosti ribonukleazy i α -amilazy slyuny i slyunnykh zhelez u krys linii Vistar [Seasonal features of ribonuclease and α -amylase activity of saliva and salivary glands in Wistar rats]. Leningrad: Nauka, 1973. P. 192–195.

Lysenko L. A., Kantserova N. P., Tushina E. D., Polyakova N. V., Lajus D. L., Nemova N. N. Raznokachestvennost' trekhigloi kolyushki (*Gasterosteus aculeatus*) Belogo morya v nachale neresta po aktivnosti kal'tsiyavisimykh proteinaz i populyatsionnym kharakteristikam [The White Sea threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, differentiation at the beginning of spawning by the activity of calcium-dependent pro-

teases and population characteristics]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2018. No. 5. P. 79–88. doi: 10.17076/eco700

Murzina C. A., Nefedova Z. A., Pekkoeva S. N., Voronin V. P., Lajus D. L., Ivanova T. S., Nemova N. N. Lipidnyi i zhirkokislotnyi status pecheni i gonad trokhigloi kolyushki *Gasterosteus aculeatus* (sem. Kolyushkovye, Gastrosteidae) s raznykh nerestilishch v Belom more [Lipid and fatty acid status of liver and gonads of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Gastrosteidae) from different spawning places in the White Sea]. *Izv. RAN. Ser. Biol.* [Biol. Bull.]. 2018. No. 6. P. 593–602. doi: 10.1134/S0002332918060085

Nemova N. N. Vnutrikletochnye proteoliticheskie fermenty u ryb [Intracellular proteolytic enzymes in fish]. Petrozavodsk: KarRC RAS, 1996. 104 p.

Ozernyyuk N. D. Fenomenologiya i mekhanizmy adaptatsionnykh protsessov [Phenomenology and mechanisms of adaptation processes]. Moscow: MGU, 2003. 215 p.

Pokrovskii A. A., Archakov A. I. Metody razdeleniya i fermentnoi identifikatsii subkletochnykh fraktsii [Methods of separation and enzymatic identification of subcellular fractions]. *Sovr. metody v biokhim.* [Modern methods in biochem.]. Moscow: Meditsina, 1968. P. 5–59.

Rendakov N. L. Nekotorye aspekty steroidnoi regulatsii u kostistykh ryb [Some aspects of steroid regulation in Teleosts]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2018. No. 6. P. 3–21. doi: 10.17076/eb777

Vysotskaya R. U., Nemova N. N. Lizosomy i lizosomal'nye fermenty ryb [Fish lysosomes and lysosomal enzymes]. Moscow: Nauka, 2008. 284 p.

Vysotskaya R. U., Lomaeva T. A., Taksheev S. A., Amelina V. S., Bakhmet I. N. Aktivnost' lizosomal'nykh i nekotorykh drugikh fermentov v tkanyakh midii pri raznom urovne solenosti [Lysosomal and some other enzymes activity in tissues of *Mytilus edulis* under different salinity]. *Probl. izucheniya, ratsional'nogo ispol'z. i okhr. resursov Belogo morya: Mat. IX mezhdunar. konf.* [Probl. of study, sustainable use and conservation of natural resources of the White Sea: Proceed. IX int. conf. (Oct. 11–14, 2004. Petrozavodsk)]. Petrozavodsk: PIN, 2005. P. 72–75.

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(3). P. 317–334.

Demchuk A. S., Ivanov M. V., Ivanova T. S., Polaykova N. V., Mas-Marti E., Lajus D. L. Feeding patterns in seagrass beds of three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* juveniles at different growth stages. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 2015. Vol. 95(8). P. 1635–1643. doi: 10.1017/S0025315415000569

Ivanova T. S., Ivanov M. V., Golovin P. V., Polyakova N. V., Lajus D. L. The White Sea threespine stickleback population: spawning habitats, mortality, abundance. *Evol. Ecol. Res.* 2016. Vol. 17(3). P. 301–305.

Kahovcova J., Odavic R. A simple method of the quantitative analysis of phospholipids separated by thin layer chromatography. *J. Chromatogr.* 1969. Vol. 40. P. 90–96.

Rybkina E. V., Demchuk A. S., Lajus D. L., Ivanova T. S., Ivanov M. V., Galaktionov K. V. Dynamics of parasite community during early ontogenesis of marine threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Evol. Ecol. Res.* 2016. Vol. 17(3). P. 335–354. URL: <http://evolutionaryecology> (accessed: 10.10.2018).

Rybkina E. V., Ivanova T. S., Ivanov M. V., Kucheryavyy A. V., Lajus D. L. Habitat preference of three-spined stickleback juveniles in experimental conditions and in wild eelgrass. *J. Mar. Biol. Ass. UK.* 2017. Vol. 97(7). P. 1437–1445. doi: 10.1017/S0025315416000825

Stinchcombe J., Bossi G., Griffiths G. M. Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science.* 2004. Vol. 305. P. 55–59. doi: 10.1126/science.1095291

Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiol.* 2005. Vol. 15, no. 6. P. 1R – 15R. doi: 10.1093/glycob/cwi041

Received October 17, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Высоцкая Римма Ульяновна

главный научный сотрудник лаб. экологической биохимии, 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: rimma@bio.krc.karelia.ru
тел.: (8142) 571879

Буэй Елизавета Андреевна

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: elizaveta.vdovichenko@gmail.com
тел.: (8142) 571879

CONTRIBUTORS:

Vysotskaya, Rimma

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

Buoy, Elizaveta

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

Лайус Дмитрий Людвигович

доцент, к. б. н.
Санкт-Петербургский государственный университет,
кафедра ихтиологии и гидробиологии
16-я линия В. О., 29, Санкт-Петербург, Россия, 199178
эл. почта: dlajus@gmail.com

Lajus, Dmitry

Saint-Petersburg State University,
29, 16th Line V. O., 199178 St. Petersburg, Russia
e-mail: dlajus@gmail.com

УДК 639.041.2: 597.552.51 (282.247.213/.218)

ИСПЫТАНИЕ ГНЕЗД-ИНКУБАТОРОВ ИКРЫ КЕТЫ (*ONCORHYNCHUS KETA*) «ШАЙБА 400» В МАЛЫХ ПРИТОКАХ РЕКИ МАЛКА (О. САХАЛИН)

**Д. А. Ефремов^{1,3}, А. Е. Веселов^{1,3}, М. А. Ручьев^{1,3},
М. А. Скоробогатов^{2,3}, Л. К. Федорова⁴, А. И. Мадудин⁵**

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН»,
Петрозаводск, Россия

² Тверской государственный технический университет, Россия

³ Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН,
Москва, Россия

⁴ Сахалинский государственный университет, Южно-Сахалинск, Россия

⁵ ООО «Нерест-2008», Сахалинская обл., Россия

Представлен результат внезаводского метода воспроизводства кеты (*Oncorhynchus keta*), испытанного в малых притоках р. Малка (бассейн Охотского моря, Татарский пролив). Использованы специально сконструированные гнезда-инкубаторы, устанавливаемые на дно порогового участка реки. Каждое устройство представляет собой обтекаемую емкость, внутри которой в два яруса размещены инкубационные пластины с лунками для икры. В дне устройства имеется водозаборник, обеспечивающий постоянное поступление свежей воды, сверху установлен выпускной патрубок для выноса воды с продуктами жизнедеятельности эмбрионов из устройства. Гнездо позволяет инкубировать в течение зимы оплодотворенную икру кеты и весной получать жизнестойких личинок, самостоятельно расселяющихся в пороге реки или принудительно извлекаемых из устройств для подращивания в бассейнах. В ходе испытания выявлены как преимущества (повышенная емкость для инкубируемой икры до 404 икринок кеты на устройство, щели на дне лунок, ограничивающие икринки от проваливания в нижнюю накопительную камеру в период инкубации и одновременно позволяющие выходить личинкам в накопительную камеру после вылупления), так и конструктивные недостатки (слабая проточность при кассетном способе установки, а также нарушение проточности в условиях забивания водозаборного патрубка песком). В целом эффективность выклева личинок составила 97,8 %. Выход малька в реку не превысил 48,7 %. Гибель части мальков произошла из-за нарушения проточности устройств в результате критического падения уровня воды в зимнюю межень, а также из-за высокого, до 25 см, уровня наносов. Большой отход, в некоторых устройствах до 100 %, наблюдался в гнездах, установленных кассетами. При незначительной доработке устройство можно использовать для восстановления численности кеты и других тихоокеанских лососей в небольших реках.

Ключевые слова: внезаводской метод инкубации; икра кеты; гнезда-инкубаторы «Шайба 400»; технологии инкубации.

D. A. Efremov, A. E. Veselov, M. A. Ruch'ev, M. A. Skorobogatov, L. K. Fyodorova, A. I. Madudin. TRIALS OF "SHAYBA 400" INCUBATION NESTS FOR CHUM SALMON (*ONCORHYNCHUS KETA*) EGGS IN SMALL TRIBUTARIES TO THE MALKA RIVER (SAKHALIN ISLAND)

The outcome of a non-hatchery method for chum salmon (*Oncorhynchus keta*) reproduction is presented. The method was tested in small tributaries to Malka River (Sea of Okhotsk catchment, Tatar Strait). Specially designed incubation nests were deployed on the bottom of river stretches with rapids. Each device is a streamlined flattened vessel with two layers of incubation plates with wells for individual egg. There is a water inlet in the bottom of the device to secure continuous supply of fresh water; water with embryos' waste products is washed out of the device through an outlet tube on the top. The nest allows incubating fertilized chum salmon eggs during the winter and get viable larvae in spring, who would then either disperse across the rapid by themselves or be taken out of the devices to be post-reared in pools. The trial revealed both strengths (higher capacity for the incubated eggs – up to 404 chum salmon eggs per device, slots in the bottom of the wells preventing eggs from falling through to the underlying collection chamber during incubation but at the same time allowing the movement of larvae to the collection chamber after hatching) and structural flaws (poor water flow in the cassette installation mode, as well as flow blockage by sand clogging the water intake pipe). Overall, the hatching rate was 97.8 %. Not more than 48.7 % exited the nest as larvae. Mortalities were partially due to the blockage of flow through the devices as a result of a critical drop in the water level during the winter low water period, and to the high sediment load, up to 25 cm. Losses were higher, in some devices up to 100 %, in the nests with cassette-type installation. After a minor upgrade, the device can be used to restore the numbers of chum salmon and other Pacific salmon species in small rivers.

Key words: non-hatchery incubation method; chum salmon eggs; nests incubators "Shayba 400"; incubation techniques.

Введение

Лососевые виды рыб в ходе эволюционного развития приобрели сложный жизненный цикл, включающий приуроченность к пресноводным водотокам в период размножения и роста молоди, а также необходимость миграции в нагульный период к водоемам, богатым пищевыми ресурсами, находящимся иногда за тысячи километров от места выклева личинки. Одним из наиболее критических периодов жизни лососей является период инкубации и выклева икры в грунте пресных водотоков. В этот период наблюдается наибольший уровень отхода неоплодотворенной икры, а также эмбрионов – до 90 % от икры, сформированной самкой в период нагула и созревания. В связи с этим уже более века ведутся работы, направленные на оптимизацию естественного нереста производителей лососевых рыб и повышение эффективности инкубации икры, с целью повысить продуктивность естественных нерестилищ и увеличить возврат товарной рыбы. Одно из направлений этой деятельности посвящено разработке искусственных устройств для инкубации лососевой икры в естественных условиях рек [Donaghy, Verspoor, 2000; Лупандин и др., 2005; Dumas, Marty, 2006; Веселов и др., 2007, 2011;

Pander et al., 2009]. Эти устройства с искусственно оплодотворенной икрой размещают на порогах и перекатах рек. По завершении инкубационного периода жизнестойкие личинки лососевых рыб самостоятельно расселяются из гнезд-инкубаторов по порогам и ведут характерный для дикой молоди образ жизни (их рост и развитие происходит на естественной кормовой базе). Также устройства предусматривают дальнейшее подращивание молоди в искусственно созданных заводях, бассейнах, прудах и т. д. с применением различных кормов.

На базе лаборатории экологии рыб и водных беспозвоночных Института биологии КарНЦ РАН уже больше 20 лет ведутся разработки искусственных гнезд-инкубаторов икры, сконструировано и испытано более 25 образцов гнезд-инкубаторов. В устройстве типа «Шайба» удалось добиться наибольшей эффективности выхода жизнестойких личинок – до 97 % [Веселов и др., 2011], но рассчитано оно на инкубацию только 100 икринок, что недостаточно для работ по интенсивному восстановлению запасов лососевых видов рыб. В ходе взаимодействия с рыбопромышленниками Сахалинской области была поставлена задача создать более емкое устройство для инкубации икры тихоокеанских лососей, позволяющее получать молодь рыб в больших

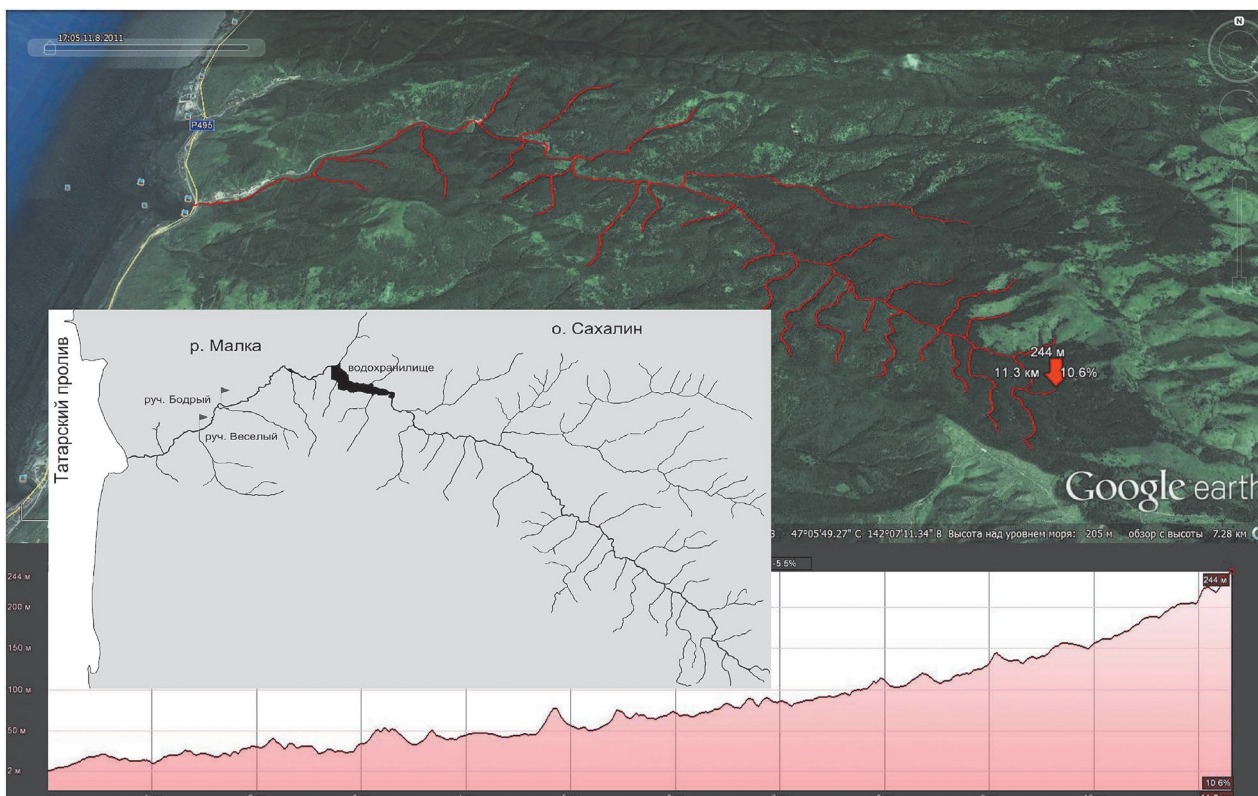


Рис. 1. Карта-схема водосбора и продольного профиля реки Малка. Стрелкой обозначен исток реки (из Google Earth)

Fig. 1. A schematic map of the catchment and elevation distance curve of the Malka River. The source of the river is shown by the arrow (as per Google Earth)

объемах. Гнездо-инкубатор типа «Шайба» было усовершенствовано, разработанное на его базе устройство получило наименование «Шайба 400». В нем изменен способ расположения икринок, выхода личинок, метод загрузки икры, а также внедрен принцип многослойного расположения инкубационного субстрата. Проведены испытания устройства с заложенной икрой Кумжи в ручье Улмосен-йоки [Ручьев и др., 2016], в ходе которых выявлен ряд недостатков макетного образца устройства. На основе натуральных испытаний устройство было доработано и подготовлено к испытаниям в реках Дальнего Востока с заложенной икрой тихоокеанского лосося – кеты (*Oncorhynchus keta*).

Цель работы – провести испытания конструкций гнезд-инкубаторов «Шайба 400» повышенной вместимости с заложенной в них икрой кеты на стадии развития «глазков», установленных двумя способами – одиночно и касетным способом; получить жизнестойких личинок с целью их принудительного извлечения из устройств для дальнейшего подращивания в бассейне и выпуска на нагул в море; выявить и устранить возможные конструктивные недостатки устройств и способов их установки.

Материалы и методы

Испытания гнезд-инкубаторов «Шайба 400» проводили в реке Малка. Это умеренно-холодноводный водоток горно-равнинного типа, достаточно разветвленный, главное русло принимает 28 притоков (рис. 1), часть из которых пересыхают в летний или зимний период. Бассейн реки на севере граничит с рекой Ханкотан, на востоке – с бассейнами рек Андросовка и Кама, а на юге – с рекой Одиночка. Река протекает в горно-холмистой местности юго-западной части острова Сахалин. Исток ее находится в горной (гора Камышовая) болотистой местности на высоте 246 м над уровнем моря (47°22'22" с. ш., 142°03'10" в. д.), а впадает река в Татарский пролив между Японским и Охотским морями (47°21'24" с. ш., 141°59'51" в. д.) (рис. 1).

Следует отметить, что в нижнем течении с левой стороны на расстоянии 950 и 1100 м от устья реки расположены два незамерзающих притока – ручьи Бодрый и Веселый, температура воды в которых зимой не опускается ниже 3,5 °С. Длина этих притоков около 1 км, ширина 0,3–0,5 м, скорость течения 0,2–0,5 м/с. Рас-

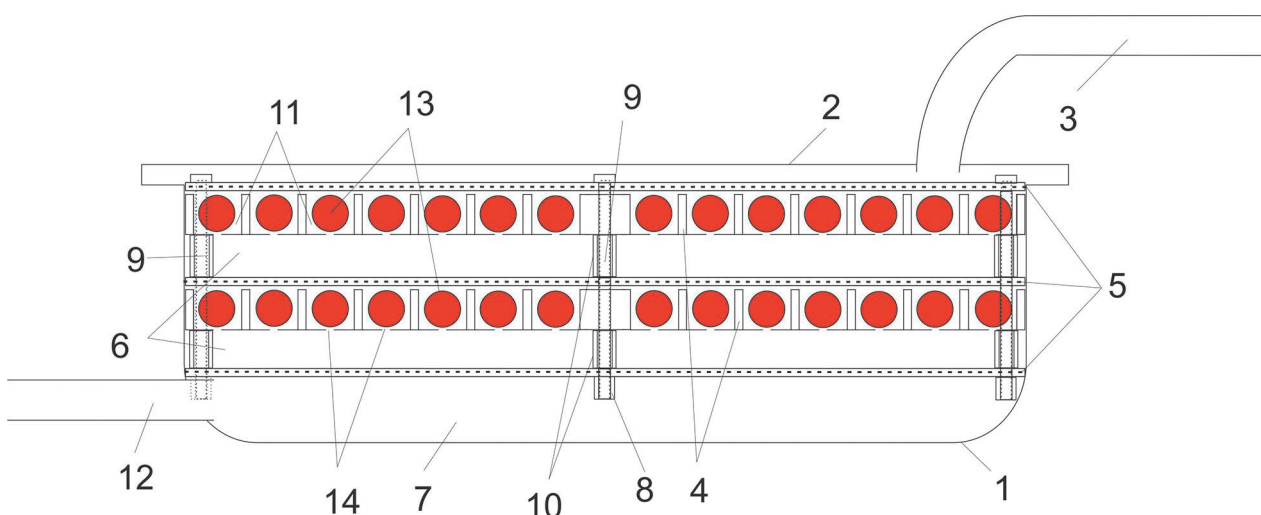


Рис. 2. Гнездо-инкубатор икры «Шайба 400»: 1 – корпус; 2 – крышка; 3 – выпускной патрубок; 4 – пластина с канавками для икры; 5 – удерживающая решетка с сеткой; 6 – накопительная камера; 7 – отстойная камера; 8 – гайка М4; 9 – болт М4/70 мм; 10 – втулка М5; 11 – инкубационные канавки; 12 – впускной патрубок; 13 – инкубируемая икра; 14 – щели 4 мм для выхода личинок в нижележащую накопительную камеру

Fig. 2. “Shayba 400” incubation nest: 1 – body; 2 – cover; 3 – outlet tube; 4 – incubation plate with wells for eggs; 5 – holding grating with a net; 6 – collection chamber; 7 – settling chamber; 8 – nut M4; 9 – bolt M4/70 mm; 10 – bush M5; 11 – incubation wells; 12 – inlet tube; 13 – incubated eggs; 14 – 4 mm slots allowing the movement of larvae to the collection chamber

ход воды составляет менее 0,2 м³/с. Береговая растительность сформирована из ивы, ольхи, ели, иногда пихты, встречается белая береза, тополь и рябина, мелкие кустарнички. В верхнем и среднем течении берега обрастают курильским бамбуком. Гнезда устанавливали на галечный грунт на участках ручьев с поверхностной скоростью течения 0,4 м/с и глубиной 0,3 м.

В работе использовалось модифицированное двухслойное гнездо-инкубатор вместимостью 404 икринки «Шайба 400» (рис. 2). Устройство выполнено из пищевого пластика – полиэтилентерфталата (PET). Данное устройство устанавливали без использования дополнительного груза в виде стальных колец, в качестве груза использовали мелкие валуны и гальку.

Из способов установки гнезд на речное дно выделяют одиночный и кассетный. В нашем случае были применены оба способа установки. Практика показала, что одиночные конструкции устойчивы к паводкам и удобны для использования в реках с неровным рельефом дна. Конструкции были выставлены на небольших, площадью 1–2 м², участках ручьев Бодрый и Веселый. На участках установки были подготовлены площадки с глубинами 0,2–0,3 м и поверхностными скоростями течения 0,2–0,3 м/с. Часть устройств устанавливали кассетным способом с использованием дополнительного водозаборника, соединительного патрубка и сепаратора, распределяющего воду на устройства.

Кассетным способом устройства устанавливали в группы по 5 и 8 штук.

Выбранный тип конструкций относится к группе необслуживаемых гнезд-инкубаторов. Так как перед попаданием в конструкцию вода фильтруется через слой грунта, количество иловых и взвешенных частиц значительно снижается. В этом случае не требуется периодически обслуживать гнезда, заменяя фильтры и удаляя погибших личинок.

Икру для закладки в гнезда брали на рыбноводном заводе, расположенном на реке Сова (ОАО ЛРЗ «Доримп», место покупки посадочного материала), на стадии «глазок». На этой стадии эмбрионы нечувствительны к встряске и их можно транспортировать к реке. Работы по установке гнезд-инкубаторов в реку осуществлялись 7 ноября. Места установки обозначены на рис. 3.

Икра была заложена в гнезда-инкубаторы «Шайба 400», имеющие конструктивные отличия от предыдущих испытанных нами устройств [Веселов и др., 2007, 2011; Ручьев и др., 2016]. Устройство для инкубации икры и получения личинок тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* выполнено в виде цилиндрического контейнера с впускным патрубком, расположенным в его нижней части, снабженного крышкой с выпускным патрубком. Внутреннее пространство контейнера разделено на инкубационные пластины-субстрат, накопительную и отстойную камеры удерживающей решеткой



Рис. 3. Карта-схема нижнего участка реки Малка. Стрелкой обозначено устье ручья Веселый (18 м над ур. моря, 1,21 км от устья), желтыми кнопками показано место установки гнезд-инкубаторов и бассейна для подращивания молодежи (из Google Earth)

Fig. 3. A schematic map of the lower part of the Malka River. The mouth of the Vesely Stream is shown by the arrow (18 m above sea level, 1,21 km from the mouth), yellow pins indicate the sites of the incubation nests installation and the pool for juveniles maturing (as per Google Earth)

с защитной сеткой. Над накопительной камерой на расстоянии от удерживающей решетки закреплены две инкубационные пластины, в которых по концентрическим окружностям образованы инкубационные канавки для расположения в них оплодотворенных икринок, рассчитанные на инкубацию 4–5 эмбрионов кеты каждая. На дне каждой канавки выполнена сквозная щель для выхода личинок в нижележащую накопительную камеру. Над пластиной с оплодотворенной икрой для исключения выноса икры и личинок закреплена прижимная решетка с защитной сеткой. Прижимная и удерживающая решетки с защитными сетками связаны с пластинами через втулки крепежными элементами, фиксирующими каждый диск с икрой на заданной высоте внутри основного корпуса. Защитная сетка выполнена с ячейками размером 1 × 1 мм. Контейнер снабжен одним-двумя входными перфорированными патрубками длиной от 0,3 до 1 м.

Устройство работает следующим образом. Гнездо-инкубатор рассчитано на одновременную инкубацию 400–500 икринок кеты. Устройство устанавливают в осенний период до ледостава или в зимнее (весеннее) время при наличии ледяного покрова на реке по одному или группой через пропиленную майну или естественные промоины (рис. 4). При установке устройства сначала отдельно снаряжают пластины с канавками. Пластины снаряжают

на ровной поверхности под слоем воды с помощью дополнительного устройства для равномерного снаряжения инкубационного субстрата в виде диска из пластика толщиной 5 мм с лунками для икры и ограничивающей пленкой. Силиконовой кистью икринки равномерно распределяют по лункам до их заполнения. Диск с установочными отверстиями располагают над пластиной с канавками с помощью крепежных элементов. Далее на диск с помощью мерного стаканчика выливают порцию икры в количестве от 210 до 250 штук и распределяют ее с помощью силиконовой кисточки по отверстиям диска. Излишки икринок удаляют с поверхности диска. Посадочная пластина отделена от диска пластиковой пленкой, которую удаляют при сборке устройства. Икринки проваливаются через отверстия диска, которые ориентированы над канавками пластины, и равномерно в них распределяются (в каждую из канавок помещается 4–5 икринок), после чего диск удаляют. Затем начинают собирать все детали послойно. Сначала на 5 болтов надевают одну защитную решетку с сеткой через установочные отверстия; на 5 болтов надевают 5 втулок, по одной на каждый; следом на болты через технические отверстия надевают пластину с икринками в канавках. Сверху пластину накрывают защитной решеткой с сеткой. Далее на болты надевают еще 5 втулок, а затем – вторую пластину с икринками в канавках, следом – верхнюю за-



а) подготовка участка ручья для установки гнезд



б) ручей Бодрый, подготовленные участки для установки гнезд



в) ручей Веселый, подготовленные участки для установки гнезд



г) загрузка икры в диск



д) установка диска с икрой на направляющие



е) сборка гнезда «Шайба 400»



ж) установка гнезд «Шайба 400», кассета 8 шт.



з) установка гнезд «Шайба 400», одиночно



и) установленные гнезда «Шайба 400»

Рис. 4. Река Малка. Этапы подготовки гнезд-инкубаторов: сборка конструкций, загрузка икры, установка на специально подготовленное дно

Fig. 4. The Malka River. Stages of nests incubators preparation: assembling, eggs loading, installation on the specially prepared bottom

щитную решетку с сеткой через крепежные отверстия, в конце на 5 болтов затягивают 5 гаек. Собранный конструкцию помещают в основной корпус с предварительно установленным впускным патрубком, закрывают его крышкой с установленным выпускным патрубком, закрепляют на корпусе устройства с помощью двух пластиковых хомутов. Снаряженное устройство с оплодотворенной икрой сразу помещают в воду, чтобы избежать обсыхания икринок. Устройство устанавливают одиночно либо группами на грунте речного русла, пригодного для обитания молоди лосося. Чистая вода из подруслового потока поступает в отстойную камеру через водозабор, находящийся на поверхности грунта русла реки, и далее естественным током

через нижнюю защитную сетку поступает в нижнюю накопительную камеру, затем в нижнюю пластину с канавками, из нее через инкубационные канавки, через среднюю защитную сетку поступает в верхнюю накопительную камеру и из нее через инкубационные канавки верхней пластины, через верхнюю защитную сетку – под крышку основного корпуса и изливается наружу через выпускной патрубок, обеспечивая отток метаболитов. Вылупившиеся из икринок личинки некоторое время находятся в инкубационных канавках, а затем ундулирующими движениями тела и хвоста проталкивают себя через выходные щели диска в нижележащую накопительную камеру, на поверхность защитной сетки, где и лежат на боку, омываемые струйками воды,

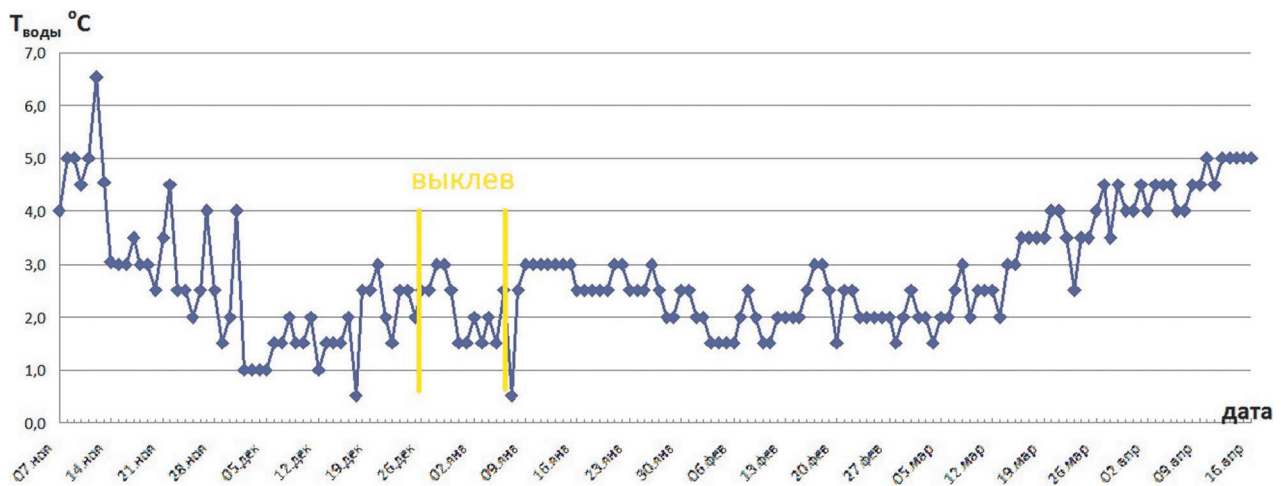


Рис. 5. Температурный режим ручья Бодрый (река Малка, 07.11.2014–20.04.2015), желтым показан расчетный период наступления и окончания вылупления предличинок

Fig. 5. Temperature regime of the Bodry Stream (the Malka River, 07.11.2014–20.04.2015), the estimated beginning and the end of polarvae hatching are shown by the yellow lines

при этом оболочки от икринок остаются в инкубационных канавках. В течение 12–16 суток личинки поднимаются «на плав» в накопительных камерах. При рассасывании желточного мешка и проявлении плавательной способности личинки начинают хаотично перемещаться по камерам. Личинок извлекают из инкубационных камер при вскрытии устройства, после чего их пересчитывают и выпускают в водоем. Обычно это происходит в конце мая – начале июня. После выхода личинок устройство поднимают со дна реки, разбирают, очищают от ила и наносов, промывают защитную сетку либо заменяют при необходимости. Устройство можно использовать вторично. Количество циклов использования устройства не ограничено, по мере повреждения возможно заменять отдельные элементы конструкции.

Температурный режим реки Малка. Измерение температуры в ручье Бодрый (река Малка) проводили на протяжении всего периода установки гнезд с помощью логгера DS9490B. Датчик запрограммировали на измерение температуры ежедневно в 18.00 по сахалинскому времени (GMT +11). Далее поместили его в пластиковый контейнер. В качестве груза использовали мелкую гальку. Затем контейнер погрузили в реку на участок установки гнезд в затишную зону, привязав веревкой к корням деревьев. 16 апреля 2015 года логгер подняли со дна. Затем с помощью ПК сняли показания, которые представлены на рис. 5. За период установки было сделано 161 измерение температуры. После измерения логгер снова вернули на тот же участок реки для продолжения измерения температуры в летний период.

Температурный режим на протяжении всего периода инкубации был нестабильным. После осеннего снижения температуры с 5 до 3 °C с начала ноября до начала апреля следующего года показатель колебался в диапазоне 1,0–4,0 °C. По-видимому, это связано с небольшими размерами водотока, температура воды которого менялась вслед за изменениями температуры воздуха. В то же время падения ниже 1 °C наблюдались лишь дважды на один день – вероятно, ручей имеет родниковое питание, что обеспечивает относительно высокую температуры воды в ручье на протяжении зимы. Зная температуру воды и то, что выклев кеты происходит примерно при 500 градусоднях, рассчитали примерные даты вылупления предличинок. По расчетным данным, выклев предличинок продолжался с 27.12 по 7.01. Далее в гнездах-инкубаторах находились предличинки и личинки.

Гидрологический режим реки. По наблюдениям, проведенным сотрудниками ООО «Фермер», уровень воды в реке в период с третьей декады ноября по вторую декаду марта практически не изменялся. Цветность воды в этот период составляла около 0 баллов.

Весной наблюдалось раннее таяние снега, в связи с чем паводок на реке Малка начался на две недели ранее обычных сроков и пришелся на третью декаду марта. Уровень воды в реке в этот период повышался не более чем на 0,5 м, однако вода была очень мутной, грязной и имела цвет кофе с молоком. В этот же период наблюдался рост уровня воды и в ручьях Веселый и Бодрый, но вода в них оставалась прозрачной.



Рис. 6. Ручьи Веселый и Бодрый (река Малка). Этапы снятия гнезд, разборка, выгрузка живых личинок, транспортировка в бассейн для подращивания

Fig. 6. The Vesely and Bodry Streams (the Malka River). Stages of nests removal, disassembling, living larvae unloading, transporting to the pool for maturing

Результаты и обсуждение

В ручей Веселый 7 ноября заложено 11 гнезд-инкубаторов «Шайба 400», из них 6 одиночно и 1 кассета из пяти гнезд; в ручей Бодрый – 25 гнезд «Шайба 400», из них 17 одиночно и 1 кассета из восьми гнезд. В каждое устройство было заложено по 404 икринки, всего 14544 икринки.

Работы по снятию конструкций начались в апреле следующего года в ручье Веселый. Снятие гнезд завершилось 21 апреля. Вода в ручье Веселый прозрачная, хорошо видно дно реки. Заиление незначительное, гнезда были занесены гравием и песком, некоторые на 20–25 см. Имелось небольшое количест-

во мелкодисперсного ила в затишных зонах. По берегам лежал нерастаявший снег.

При снятии все гнезда освободили от валунов и наносов. Далее по одному поднимали на берег, рукой перекрывая отверстия водозаборника для сохранения внутри воды и избегания потери мальков. На берегу устройства помещали в емкость с водой, таким образом, чтобы гнездо целиком находилось в воде. Далее отрезали хомуты и вскрывали устройства. С помощью ножниц открывали крышку гнезда, с помощью крючков извлекали пластину с ячейками. Мальков из инкубационной камеры помещали в емкость с ситом (рис. 6). Затем считали живых личинок и пересаживали их в емкость для транспортировки. Также

вели подсчет погибших личинок и эмбрионов (табл.).

Во всех гнездах основная доля отхода пришлась на личинок (остаток желтка 20–30 % от массы тела). По-видимому, их гибель произошла за 2–4 недели до вскрытия гнезд 20 апреля. Наблюдаемая гибель личинок старшего возраста (с остатком желточного мешка 20–30 %) указывает на резко ухудшившиеся условия содержания в период межени (конец февраля – март). Основная гибель произошла в результате недостатка проточности внутри устройства, который мог быть вызван снижением уровня воды в ручьях. Также причиной гибели эмбрионов стал высокий, до 25 см, уровень наносов гравия и песка над устройствами, что нарушило подрусловой поток. Большой отход, иногда до 100 %, наблюдался в гнездах, установленных кассетами. В нижестоящих гнездах в рамках одной кассеты выживаемость была высокой, в вышестоящих наблюдался значительный отход личинок. Вероятно, установка гнезд в разных уровнях на одном водозаборнике привела к смещению проточности к нижестоящим гнездам в период межени, при низком уровне воды в верхние гнезда вода не поступала вовсе.

В гнездах «Шайба 400» все мальки находились внутри устройства. В некоторых гнездах наблюдался повышенный отход личинок – до 100 % от заложенной икры, эти гнезда были покрыты слоем песка и глины на 20–25 см. Средняя эффективность инкубации в гнездах «Шайба 400» составила 97,8 %. Из 14544 заложенных икринок помещено в бассейн 7079 мальков (эффективность получения малька составила 48,7 %) и 230 мальков покинули гнезда самостоятельно.

Основная доля отхода пришлась на предличинок, причиной гибели стал недостаток проточности внутри устройства вследствие падения уровня воды в ручье в зимнюю межень (рис. 7).

В результате подсчетов установлено, что 2779 мальков не обнаружены ни в живых, ни в погибших экземплярах. Поскольку большое количество погибших и живых личинок находилось в нижней камере, мы считаем, что указанное выше количество личинок самостоятельно покинули устройства и скатились в море. По окончании работы гнезда сняли, промыли от остатков ила и приготовили к хранению и восстановлению для будущей установки.

При вскрытии некоторых личинок повредили, одну-две на устройство. Это связано с плотной подгонкой инкубационных дисков к стенкам

корпусов устройства, в дальнейшем следует изменить способ изъятия дисков из основного корпуса, снизив диаметр дисков либо добавив дополнительную ручку для изъятия устройства.

Как положительный результат отметим, что во всех гнездах-инкубаторах были получены личинки кеты, в некоторых выход личинок достиг 97,8 %. В связи с особенностями реализуемой программы выходных отверстий в устройствах предусмотрено не было. Мальки располагались главным образом в накопительных камерах (по две на каждое устройство), часть личинок, единично, при вскрытии были обнаружены в инкубационных лунках, мальков отсюда извлекали после окончательной разборки конструкции. В лунках преимущественно оставались оболочки от икринок, а также погибшие эмбрионы, что положительно отразилось на результате: личинки после вылупления переходили в накопительные камеры и были изолированы от погибших эмбрионов и оболочек икринок. Также следует отметить, что в вышележащих пластинах обнаружено больше погибших эмбрионов. Вероятно, это связано с недостатком проточности в период межени – при падения уровня воды в ручье проточность внутри устройства значительно сократилась, в результате уровень содержания кислорода в воде был недостаточен для дыхания эмбрионов в обоих дисках, к вышележащему диску поступала вода с недостатком кислорода. В этом случае необходимо усилить проточность внутри устройства за счет доработки водозаборника, а также следует сбалансировать проточность верхней и нижней инкубационной пластины.

В ходе испытания была подтверждена эффективность дополнительного устройства для дозирования икры, закладываемой в каждый отдельный диск. Устройство, включающее диск из пластика со сквозными лунками по размеру эмбрионов, а также съемный ограничительный лист, позволяло в короткий срок, не более 2 минут, отмерять и помещать в каждый диск по 202 икринки кеты. Ранее в устройствах с подобным субстратом [Федорова и др., 2015; Ручьев и др., 2016] время снаряжения одного диска составляло более 15 минут, что негативно сказывалось на качестве закладываемой икры, эмбрионы в условиях низких температур чрезмерно охлаждались, иногда замерзали. При сборке устройства двумя сборщиками, при которой один распределяет икру, а второй собирает устройство, время снаряжения гнезда-инкубатора «Шайба 400» не превышало 8 минут. К негативным особенностям сборки следует отнести высокую детальность устройства. Крепежная система включает более 20 мелких эле-

Результаты инкубации икры и выдерживания предличинки кеты в реке Малка, гнезда установлены одиночно и кассетным способом

Results of eggs incubation and chum salmon prolarvae maturing in the Malka River, single and cassette-type installation of nests

«Шайба 400», одиночно «Shayba 400», single				«Шайба 400», кассетами «Shayba 400», cassette-type			
№	заложено put	найдено живых found alive	выход outcome %	№	заложено put	найдено живых found alive	выход outcome %
ручей Веселый Vesely Stream							
1	404	289	71,5	7.1	404	44	10,9
2	404	208	51,5	7.2	404	312	77,2
3	404	362	89,6	7.3	404	88	21,8
4	404	3	0,7	7.4	404	1	0,2
5	404	6	1,5	7.5	404	115	28,5
6	404	373	92,3				
Итого Total	2424	1241	51,2		2020	560	27,7
Всего Sum total	4444	1801	40,5				
ручей Бодрый Bodry Stream							
1	404	0	0	18.1	404	0	0
2	404	0	0	18.2	404	0	0
3	404	361	89,4	18.3	404	36	8,9
4	404	367	90,8	18.4	404	0	0
5	404	0	0	18.5	404	231	57,2
6	404	1	0,2	18.6	404	336	83,2
7	404	395	97,8	18.7	404	255	63,1
8	404	199	49,3	18.8	404	0	0
9	404	352	87,1				
10	404	111	27,5				
11	404	373	92,3				
12	404	391	96,8				
13	404	389	96,3				
14	404	375	92,8				
15	404	346	85,6				
16	404	376	93,1				
17	404	384	95				
Итого Total	6868	4420	64,4		3232	858	26,5
Всего Sum total	10100	5278	52,3				
всего одиночно Sum total single	9292	5661	60,9	всего кассеты Sum total cassette- type	5252	1418	27
общая выжива- емость в реке Малка Overall survival rate in the Malka River	14544	7079	48,7				



Рис. 7. Погибшие в результате нарушения проточности внутри гнезда «Шайба 400» личинки кеты

Fig. 7. Chum salmon larvae killed as a result of flowing failure inside the "Shayba 400" incubation nest

ментов, которые сложно собрать быстро при низкой температуре воздуха. Окончательная сборка в некоторых случаях превышала по времени операцию распределения икринок по дискам, в результате одному из сборщиков приходилось ожидать второго. Например, было сложно дозировать в продолговатую лунку точное количество икры (5 или 7 шт.). В дальнейшем часть мелких деталей следует включить в конструкцию инкубационных дисков, что затруднительно сделать при мелкосерийной штамповке. Конструктивные элементы, облегчающие сборку, разработаны и будут реализованы при создании промышленного образца устройства. К преимуществам испытанной конструкции гнезда-инкубатора относится большая вместительность – до 404 икринок (по 202 шт. на одну пластину); увеличение скорости загрузки икры, что особенно важно для максимального сокращения времени контакта икры с воздухом и избегания температурного шока при разнице температуры воды и воздуха.

Испытания гнезд-инкубаторов «Шайба 400» в р. Малка проводили по короткоцикловой технологии [Павлов и др., 2014]. В данном регионе она была предпочтительна, т. к. икру до стадии «глазок» выдерживали на расположенном в 25 км рыболовном заводе на реке Сова. Также применение короткоцикловой технологии связано с особенностями гидрологического режима рек Сахалинской области. Икру от производителей получают и закладывают на рыболовный завод с августа по сентябрь, в этот

период высока вероятность прохождения тайфунов и выпадения обильных осадков, что может привести к резкому подъему уровня воды в реках и, как следствие, сносу или повреждению установленных в них гнезд-инкубаторов. В октябре–ноябре температура воздуха снижается, критические подъемы воды в результате выпадения осадков становятся редки. К этому времени инкубируемая икра достигает стадии «глазка», становится устойчива к механическим воздействиям, что позволяет транспортировать ее и закладывать в гнезда-инкубаторы. На рыболовном заводе до момента покупки икры регулярно проводили отсев погибших эмбрионов и ее профилактическую обработку антисептиками, в результате в устройства были загружены только жизнеспособные эмбрионы. В некоторых случаях короткоцикловая технология незаменима при зарыблении труднодоступных рек и притоков, доставку икры на которые осуществляют с использованием снегоходов. При проведении таких работ гнезда-инкубаторы устанавливают в пропиленные во льду майны или промоины на выбранные еще осенью площадки, на которых не происходит «перепаживания» грунта при весеннем ледоходе. Ранее короткоцикловая технология была успешно апробирована нами в 2008, 2011 и 2014 гг. на реках Суна, Лижма и Улмосен-йоки (бассейны Онежского и Ладожского озер), где выход диких личинок пресноводного лосося составил 95–97% [Веселов и др., 2011, 2013; Ручьев и др., 2016]. В эксперименте учи-

тывали, что наиболее критичный период инкубации икры связан с переходом зимней межени в паводковый режим, когда поступающая внутрь вода может существенно насыщаться губительными для эмбрионов взвесями детрита, ила или минеральными частицами [Казаров, 1982]. В нашем случае превышения содержания частиц ила в устройствах обнаружить не удалось, но устройства и водозаборники были занесены плотным слоем песка и гравия до 25 см. В связи с этим необходимо доработать водозаборники, которые позволят обеспечить необходимый уровень проточности в условиях обильных наносов в виде песка и гравия.

Разработанные нами устройства с одним или двумя ярусами ориентированы на одиночный способ установки. Испытания в реках показали, что они устойчивы к паводкам, т. к. находятся между возвышающимися валунами и удобны для использования в порогах рек с неровным рельефом дна. Обычно их выставляют по 15–50 шт. на небольшом участке порога, площадь которого варьирует от 1,5 до 6 м² [Веселов и др., 2013; Федорова и др., 2015]. Попытка применить кассетный способ установки для данных устройств привела к высокому отходу эмбрионов. В сложившихся гидрологических условиях один водозаборник не позволил обеспечить необходимую проточность в 5 и 8 устройствах на кассету в ручьях Веселый и Бодрый соответственно. Эффективность выхода личинок при кассетном способе установки устройств не превысила 30 %. В системе сообщающихся сосудов, установленных в разных уровнях, при засыпании выпускных патрубков некоторых устройств песком и гравием вода перераспределялась в нижележащие гнезда либо в гнезда со свободными от наносов выпускными патрубками. В условиях недостаточного уровня воды в ручьях в период межени это привело к прекращению подачи воды в часть гнезд-инкубаторов, повлекшему значительный отход эмбрионов. В дальнейшем при установке гнезд-инкубаторов кассетами необходимо использовать не более четырех устройств в одной кассете, а также увеличить водозаборник и диаметр соединительного патрубка и водораспределителя. Кассетного способа установки гнезд-инкубаторов «Шайба 400» следует избегать при высоком уровне наносов в водотоке. Также следует внимательно выбирать места установки гнезд, на них скорость течения у поверхности воды должна быть в пределах 0,6–0,9 м/с, а глубина составлять 0,6–0,9 м. Такие показатели типичны для естественных нерестовых участков лососевых рыб. При колеба-

нии уровня воды в реке это позволяет избежать обсыхания или промерзания гнезд в зимнюю межень [Смирнов, 1979; Tonina, Buffington, 2009].

В зависимости от чистоты воды в водотоке и, соответственно, примененного водозаборника гнезда-инкубаторы могут использовать русловое или подрусловое водное питание. При русловом водозаборе вода в устройства поступает непосредственно из речного потока, и тогда обычно используются сменные фильтры [Brenner, Schneider, 2005], а при подрусловом – из подруслового потока в галечном грунте с глубины 7–12 см, как в естественных нерестовых гнездах лососевых рыб [Павлов и др., 2014]. В этом случае за счет естественной фильтрации воды в грунте поступление взвеси внутрь устройства резко снижено. В нашем случае вода в ручьях была чистой даже в период паводка, она пригодна для применения руслового водозабора, но при этом уровень воды в зимнюю межень может быть недостаточен, что приведет к обсыханию руслового водозабора и замору эмбрионов и личинок. В связи с этим для всех гнезд-инкубаторов нами были применены подрусловые водозаборники. В результате установлено, что в зимнюю межень уровень воды достиг критически низких значений и это привело к гибели части эмбрионов в гнездах, установленных кассетами, вместе с тем удалось получить жизнестойкую молодь кеты в большей части одиночно установленных гнезд и в части гнезд, установленных кассетным способом.

В европейских странах для умеренного климата чаще всего используют русловый тип водного питания. В этом случае приходится бороться с поступлением внутрь инкубаторов губительных для эмбрионов частиц ила или детрита, в связи с чем устройства необходимо периодически обслуживать, заменяя фильтры и удаляя погибших личинок [Brenner, Schneider, 2005]. В условиях сурового климата северо-востока России, с длительным, 5–7 месяцев, периодом ледостава и высоким, до 7 м, уровнем снежного покрова (Сахалинская область, Камчатский край), обслуживаемые устройства непригодны, т. к. стоимость их обслуживания значительно повышается, делая применение нерентабельным. В связи с этим появляется необходимость разработки и применения необслуживаемых устройств, запитанных на естественно очищенном подрусловом потоке [Лупандин и др., 2005; Веселов и др., 2011, 2013; Федорова и др., 2015]. Апробация гнезд-инкубаторов «Шайба 400» показала их эффективность и автономность более 6 месяцев,

с октября по май. Таким образом, наша разработка полностью соответствует критериям необслуживаемых гнезд-инкубаторов, что позволяет применять ее во всех климатических зонах России для инкубации икры лососевых видов рыб.

Одним из важных этапов в разработке устройств для инкубации живой икры рыб является выбор материалов для их изготовления. В ходе длительного периода апробации различных модификаций выявлены материалы, непригодные для применения в целях рыбоводства: оцинкованная сталь, медные трубки и соединения из меди в инкубационных устройствах. При использовании этих материалов выживаемость эмбрионов не превышала 15–25 %. Материал изготовления гнезд-инкубаторов должен быть биоинертным. Предпочтительными являются пищевой пластик – полиэтилентерфталат (PET) и экологически чистая нержавеющая пищевая сталь 18/10 (12X18H10T). Пластиковые конструкции значительно дешевле металлических, однако требуют наличия грузового пояса, обеспечивающего придавливание к грунту. Гнезда из обоих материалов пригодны для многократного использования.

В настоящее время нами реализуются проекты по созданию гнезд-инкубаторов повышенной вместимости, главным образом для инкубации икры тихоокеанских лососей. А также ведется доработка имеющихся конструкций. В основу проектных изысканий положен принцип преемственности – все новые разработки основаны на ранее успешно апробированных устройствах. Проведенные испытания на реках Лососинка, Суна, Лижма (бассейн Онежского озера), Умба, Индера (бассейн Белого моря) показали перспективность данного направления. В результате предложен ряд новых устройств, на которые получены патенты РФ [Павлов и др., 2010, 2011, 2013, 2014 и др.; Ефремов и др., 2016]. В каждом последующем гнезде использовались удачные элементы от предыдущих инкубаторов. В результате в конструкции с выносным водозаборником эффективность инкубируемой икры достигала 94–97 %, а с придонным водозаборником – до 98 %. В устройстве «Шайба 400» повышена вместимость до 500 икринок по сравнению с вместимостью 100 эмбрионов в конструкции типа «Шайба» [Веселов и др., 2011]. Гидрологические показатели в водоеме были неблагоприятны, и это не позволило достичь высокого показателя выхода личинок.

Вместе с тем результат искусственной инкубации икры лосося, кумжи, кеты, а также других тихоокеанских лососей в естественных

условиях остается в значительной степени зависима от выбора конкретной реки. В некоторых случаях возможно применять устройства небольшими группами в сверхмалых притоках, подобных ручьям Бодрый и Веселый, с расходом воды 5–8 л/с в период межени. Предпочтительным остается использование более крупных водотоков, с глубинами на участках установки гнезд-инкубаторов 0,6–0,9 м и скоростью течения 0,5–0,9 м/с. Следует учитывать количество осадков в осенний и весенний период в связи с возможными паводками, а также в зимний период. Как показал наш опыт, в горной местности, а также в Сахалинской области и Камчатском крае к апрелю–маю возможно достижение уровня снежного покрова 6–8 метров. Таяние такого количества снега обычно затягивается и перекрывает сроки перехода личинок на смешанное питание, что не позволяет извлекать малька из устройств вовремя и, в свою очередь, может привести к повышенному отходу мальков. В таких водотоках следует устанавливать гнезда-инкубаторы с возможностью самостоятельного расселения личинок, что позволит малькам самостоятельно питаться после выхода.

Заключение

Проведенная масштабная работа по получению личинок кеты с использованием гнезд-инкубаторов «Шайба 400» оказалась успешной, удалось получить более 14500 жизнестойких личинок. Всего было апробировано 36 устройств, средняя эффективность выхода личинок составила 48,7 %. В некоторых устройствах она превысила 99 %. Выявлены ряд проблем, которые необходимо устранить при проведении аналогичных работ в будущем. Так, река Малка имеет свои индивидуальные отличия, связанные с гидрологическими особенностями и хозяйственной деятельностью человека. Устанавливая гнезда-инкубаторы в основном русле, рыбоводы становятся зависимыми от сбросов воды из вышестоящей плотины, нерегулируемых весенних паводков, что может привести к значительной гибели предличинок и личинок в этот период. В связи с негативным воздействием сбросов с плотины в основном русле реки Малка работы были перенесены в два левобережных притока – ручьи Веселый и Бодрый. Так как эти ручьи мелководные, потребовалась дополнительная подготовка участков реки к установке гнезд-инкубаторов. Необходимо создание дополнительных дамб, способствующих углублению естественных бочагов ручья. Также ручьи силь-

но замусорены остатками сухой растительности, которые также необходимо устранять. В ручьях гнезда «Шайба 400» показали разнородный результат – были как успешные гнезда с эффективностью до 97 %, так и полностью заморные с отходом 100 %. Наибольший отход происходил при кассетном способе установки гнезд, поэтому следует избегать его для этих устройств в ручьях либо размещать на одном водозаборнике не более 2–3 устройств, установленных в одном уровне. В дальнейшем для установки гнезд возможно использовать ручьи Бодрый и Веселый, основного русла реки Малка при проведении рыбоводных работ следует избегать.

Испытания гнезд-инкубаторов «Шайба 400» показали, что устройства с ярусным расположением инкубационных пластин и лунками на 5–7 икринок значительно эффективнее по емкости закладываемой икры, чем одноярусные. Применение вместо покровной мембраны в гнездах [Ручьев и др., 2016] лунок с щелями и защитной сетки позволило повысить эффективность инкубации икры и выход личинок, удалось избежать объеживания личинок при нижнем расположении ограничивающей сетки. После выклева все личинки находились в двух нижних накопительных камерах, откуда они были извлечены при вскрытии устройств и помещены в бассейн для дальнейшего подращивания. Применение щелей в лунках и верхней ограничивающей сетки в дополнение к распределительному устройству для закладки икры в диски сократило время снаряжения устройства до 8 минут, тогда как снаряжение конструкции, включающей покровную мембрану, занимало более 20 минут. В целом эффективность выклева личинок составила 94–99 %, однако выход их из гнезд не превышал 49 %.

Недостатком конструкции следует признать водозаборный патрубок с перфорациями, который при высоком уровне наносов песка и гравия был закупорен и не позволил поступать чистой воде в часть устройств. Наибольший отход личинок наблюдался в гнездах-инкубаторах, установленных кассетным способом. В условиях низкой проточности в водотоке выносной водозаборник не позволил обеспечить все устройства, установленные кассетным способом, необходимым количеством чистой воды. Вода в замкнутой системе сообщающихся сосудов распределялась неравномерно, что привело к замору личинок в большей части устройств в рамках одной кассеты. По-видимому, для установки устройств в кассеты следует увеличить диаметр выносного водозаборника, увеличить длину водозаборного патрубка,

а также сократить количество устройств в одной кассете до четырех.

Таким образом, результаты выполненных ранее и в данной работе испытаний позволяют рекомендовать для внезаводского воспроизводства кеты и других лососевых видов рыб гнезда-инкубаторы «Шайба 400». Предпочтительно, чтобы они были установлены одиночным способом. Этим обеспечивается простота установки инкубаторов, их сохранность при ледоходе, защита и устойчивость на неровном дне в паводки.

Гнезда-инкубаторы планируется использовать при восстановлении численности популяций и воссоздании стад лососевых видов рыб в реках с критически низким количеством производителей или с утраченными популяциями.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0081) – проектно-конструкторские и лабораторные работы – и частично за счет компаний ООО «Нерест-2008» и ООО «Фермер» – накладные расходы, полевой этап работ.

Литература

- Веселов А. Е., Аликов Л. В., Скоробогатов М. А., Зубченко А. В., Калюжин С. М., Шустов Ю. А., Потуткин А. Г. Искусственная инкубация икры атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в естественных условиях // Труды КарНЦ РАН. 2007. № 11. С. 14–19.
- Веселов А. Е., Павлов Д. С., Скоробогатов М. А., Ефремов Д. А., Белякова Е. Н., Потапов К. Ю. Опыт искусственной инкубации икры атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в р. Суне (бассейн Онежского озера) // Труды КарНЦ РАН. 2011. № 3. С. 28–38.
- Веселов А. Е., Павлов Д. С., Скоробогатов М. А., Ефремов Д. А., Нагирняк Г. А., Ручьев М. А. Результаты испытаний новой конструкции гнезда – инкубатора лососевой икры в речных условиях // Труды КарНЦ РАН. 2013. № 3. С. 179–184.
- Ефремов Д. А., Веселов А. Е., Скоробогатов М. А. Гнездо-инкубатор для икры лососевых рыб в естественных условиях // Патент на полезную модель № RU159183, приоритет 06.11.2015. Бюл. № 4. 2016. 4 с.
- Казаков Р. В. Биологические основы разведения атлантического лосося. М.: Легк. и пищ. пром-ть, 1982. 144 с.
- Лупандин А. И., Павлов Д. С., Веселов А. Е., Калюжин С. М. Искусственное воспроизводство атлантического лосося (*Salmo salar*) в естественных условиях // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2005. С. 434–445.
- Павлов Д. С., Скоробогатов М. А., Веселов А. Е., Калюжин С. М., Волков Б. А. Устройство для инкуба-

ции икры в естественных условиях. Патент на полезную модель № 99688. Бюл. № 33. 2010. 4 с.

Павлов Д. С., Веселов А. Е., Skorobogatov M. A., Volkov B. A. Устройство для инкубации икры лососевых рыб в естественных условиях. Патент на полезную модель № 110229. Бюл. № 32. 2011. 2 с.

Павлов Д. С., Веселов А. Е., Skorobogatov M. A., Volkov B. A., Efremov D. A. Устройство для инкубации икры и получения личинок лососевых рыб в естественных условиях. Патент на полезную модель № 127587. Бюл. № 13. 2013. 4 с.

Павлов Д. С., Веселов А. Е., Skorobogatov M. A., Efremov D. A. Патент RU 147950. Полезная модель «Устройство для инкубации икры лососевых рыб в реках». Бюл. № 32. 2014. 4 с.

Ручьев М. А., Efremov D. A., Skorobogatov M. A., Veselov A. E. Испытание гнезд-инкубаторов икры кумжи (*Salmo trutta* L.) двухъярусной конструкции в реке Улмосен-йоки (бассейн Ладожского озера) // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 6. С. 91–98. doi: 10.17076/eb344

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

Федорова Л. К., Веселов А. Е., Efremov D. A., Skorobogatov M. A., Madudin A. I. Внезаводской метод восстановления популяций как подход к сохранению биологического разнообразия тихооке-

анских лососей // Современные проблемы исследования биоразнообразия растительных и животных сообществ и пути их сохранения: Сб. материалов междунар. науч.-практ. конф. (14–17 октября 2014). Ю-Сахалинск: СахГУ, 2015. С. 90–96.

Brenner T., Schneider J. Der lachs kehrt zurück / Ministerium für Umwelt und Forsten Rheinland-Pfalz. 2005. 63 p.

Donaghy M. J., Verspoor E. A new design of in-stream incubator for planting out and monitoring Atlantic salmon eggs // N. Am. J. Fish. Manag. 2000. Vol. 20. P. 521–527. doi: 10.1577/1548-8675(2000)020<0521:AND0II>2.3.CO;2

Dumas J., Marty S. A new method to evaluate egg-to-fry survival in salmonids, trials with Atlantic salmon // J. Fish Biol. 2006. Vol. 68. P. 284–304. doi: 10.1111/j.1095-8649.2005.00907.x

Pander J., Schnell J., Sternecker K., Geist J. The “egg sandwich” a method for linking spatially resolved salmonid hatching rates with habitat variables in stream ecosystems // J. Fish Biol. 2009. Vol. 74. P. 683–690. doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.02145.x

Tonina D., Buffington J. M. A tree-dimensional model for analyzing the effects of salmon redds on hyporheic exchange and egg pocket habitat // Can. J. Fish Aquat. Sci. 2009. No. 66. P. 2157–2173. doi: 19.1139/F09-146

Поступила в редакцию 06.03.2019

References

Efremov D. A., Veselov A. E., Skorobogatov M. A. Gnezdo-inkubator dlya ikry lososevykh ryb v estestvennykh usloviyakh [The incubation nest for salmon eggs under natural conditions]. Patent for the useful model No. RU159183, priority 11.06.2015. Byul. No. 4. 2016. 4 p.

Fedorova L. K., Veselov A. E., Efremov D. A., Skorobogatov M. A., Madudin A. I. Vnezavodskoi metod vosstanovleniya populyatsii kak podkhod k sokhraneniyu biologicheskogo raznoobraziya tikhookeanskikh lososei [Extra factory method of populations restoration as an approach to restoration of biological diversity of the Pacific salmon]. Sovr. probl. issled. bioraznoobraziya rast. i zhivot. soobshchestv i puti ikh sokhr.: Sb. mat. mezhdunar. nauch.-prakt. konf. (14–17 oktyabrya 2014) [Current problems of studying the biological diversity of plant and animal communities and ways of their protection: Proceed. int. conf. (Oct. 14–17, 2014)]. Yu-Sakhalinsk: SakhGU, 2015. P. 90–96.

Kazakov R. V. Biologicheskie osnovy razvedeniya atlanticheskogo lososya [Biological bases of the Atlantic salmon breeding]. Moscow: Legk. i pishch. prom., 1982. 144 p.

Lupandin A. I., Pavlov D. S., Veselov A. E., Kalyuzhin S. M. Iskusstvennoe vosproizvodstvo atlanticheskogo lososya (*Salmo salar*) v estestvennykh usloviyakh [Artificial reproduction of an Atlantic salmon (*Salmo salar*) under natural conditions]. Fundamental'nye osnovy upravleniya biol. resursami [Fundamentals of biol. resources management]. Moscow: T-vo nauch. izd. KMK, 2005. P. 434–445.

Pavlov D. S., Skorobogatov M. A., Veselov A. E., Kalyuzhin S. M., Volkov B. A. Ustroistvo dlya inkubatsii

ikry v estestvennykh usloviyakh. Patent na poleznuyu model № 99688. Byul. № 33. 2010 [A device for eggs incubation under natural conditions. Patent for the useful model No. 99688. Bull. No. 33, 2010]. 4 p.

Pavlov D. S., Veselov A. E., Skorobogatov M. A., Volkov B. A. Ustroistvo dlya inkubatsii ikry lososevykh ryb v estestvennykh usloviyakh. Patent na poleznuyu model № 110229. Byul. № 32. 2011 [A device for salmon eggs incubation under natural conditions. Patent for the useful model No. 110229. Bull. No. 32, 2011]. 2 p.

Pavlov D. S., Veselov A. E., Skorobogatov M. A., Volkov B. A., Efremov D. A. Ustroistvo dlya inkubatsii ikry i polucheniya lichinok lososevykh ryb v estestvennykh usloviyakh. Patent na poleznuyu model № 127587. Byul. № 13. 2013 [A device for eggs incubation and receiving larvae of salmon under natural conditions. Patent for the useful model No. 127587. Bull. No. 13, 2013]. 4 p.

Pavlov D. S., Veselov A. E., Skorobogatov M. A., Efremov D. A. Patent RU 147950. Poleznaya model' "Ustroistvo dlya inkubatsii ikry lososevykh ryb v rekakh". Byul. № 32. 2014 [Patent RU 147950. A device for salmon eggs incubation in rivers. Bull. No. 32, 2014]. 4 p.

Ruch'ev M. A., Efremov D. A., Skorobogatov M. A., Veselov A. E. Ispytanie gnezd-inkubatorov ikry kumzhi (*Salmo trutta* L.) dvukh'yarusnoi konstruksii v reke Ulmosen-ioki (bassein Ladozhskogo ozera) [Trials of two-level nests for incubation of brown trout (*Salmo trutta* L.) eggs in the Ulmosen-ioki River (Lake Ladoga catchment)]. Trudy KarNTs RAN [Trans. KarRC RAS]. 2016. No. 6. P. 91–98. doi: 10.17076/eb344

Smirnov Yu. A. Presnovodnyi losos' (ekologiya, vosproizvodstvo, ispol'zovanie) [Landlocked salmon

(ecology, reproduction, management)]. Leningrad: Nauka, 1979. 156 p.

Veselov A. E., Alikov L. V., Skorobogatov M. A., Zubchenko A. V., Kalyuzhin S. M., Shustov Yu. A., Potutkin A. G. Iskusstvennaya inkubatsiya ikry atlanticheskogo lososya (*Salmo salar* L.) v estestvennykh usloviyakh [Artificial incubation of eggs of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under natural conditions]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2007. No. 11. P. 14–19.

Veselov A. E., Pavlov D. S., Skorobogatov M. A., Efremov D. A., Belyakova E. N., Potapov K. Yu. Opyt iskusstvennoi inkubatsii ikry atlanticheskogo lososya (*Salmo salar* L.) v r. Sune (bassein Onezhskogo ozera) [Experience of an artificial incubation of eggs of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the Suna River (the basin of Lake Onega)]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2011. No. 3. P. 28–38.

Veselov A. E., Pavlov D. S., Skorobogatov M. A., Efremov D. A., Nagirnyak G. A., Ruch'ev M. A. Rezul'taty ispytaniy novoi konstruktsii gnezda-inkubatora lososevoi ikry v rechnykh usloviyakh [Results of trials of a new design of the salmon eggs incubation redd in fluvial settings]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2013. No. 3. P. 179–184.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ефремов Денис Александрович

научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910

Институт проблем экологии и эволюции
им. А. Н. Северцова РАН
Ленинский пр., 33, Москва, Россия, 119071
эл. почта: denisefremov@list.ru
тел.: +79114103105, (8142) 769810

Веселов Алексей Елпидифорович

главный научный сотрудник, д. б. н., проф.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910

Институт проблем экологии и эволюции
им. А. Н. Северцова РАН
Ленинский пр., 33, Москва, Россия, 119071
эл. почта: veselov7771@mail.ru
тел.: +79114093805, (8142) 767812

Ручьев Михаил Андреевич

младший научный сотрудник
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910

Институт проблем экологии и эволюции
им. А. Н. Северцова РАН
Ленинский пр., 33, Москва, Россия, 119071
эл. почта: lsstyle@ya.ru
тел.: +79214571845, (8142) 769810

Brenner T., Schneider J. Der lachs kehrt zurück. Ministerium für Umwelt und Forsten Rheinland-Pfalz. 2005. 63 p.

Donaghy M. J., Verspoor E. A new design of in-stream incubator for planting out and monitoring Atlantic salmon eggs. *N. Am. J. Fish. Manag.* 2000. Vol. 20. P. 521–527. doi: 10.1577/1548-8675(2000)020<0521:ANDOI>2.3.CO;2

Dumas J., Marty S. A new method to evaluate egg-to-fry survival in salmonids, trials with Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* 2006. Vol. 68. P. 284–304. doi: 10.1111/j.1095-8649.2005.00907.x

Pander J., Schnell J., Sternecker K., Geist J. The “egg sandwich” a method for linking spatially resolved salmonid hatching rates with habitat variables in stream ecosystems. *J. Fish Biol.* 2009. Vol. 74. P. 683–690. doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.02145.x

Tonina D., Buffington J. M. A tree-dimensional model for analyzing the effects of salmon redds on hyporheic exchange and egg pocket habitat. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 2009. No. 66. P. 2157–2173. doi: 10.1139/F09-146

Received March 06, 2019

CONTRIBUTORS:

Efremov, Denis

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

A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution,
Russian Academy of Sciences
33 Leninskii Ave., 119071 Moscow, Russia
e-mail: denisefremov@list.ru
tel.: +79114103105, (8142) 769810

Veselov, Aleksey

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

A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution,
Russian Academy of Sciences
33 Leninskii Ave., 119071 Moscow, Russia
e-mail: veselov7771@mail.ru
tel.: +79114093805, (8142) 767812

Ruch'ev, Mikhail

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

A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution,
Russian Academy of Sciences
33 Leninskii Ave., 119071 Moscow, Russia
e-mail: lsstyle@ya.ru
tel.: +79214571845, (8142) 769810

Скоробогатов Михаил Александрович

ведущий научный сотрудник, д. т. н.
Тверской государственный технический университет
наб. Афанасия Никитина, 22, Тверь, Россия

Институт проблем экологии и эволюции
им. А. Н. Северцова РАН
Ленинский пр., 33, Москва, Россия, 119071
эл. почта: skorobogatov1@rambler.ru
тел.: +79109366948

Федорова Людмила Константиновна

старший преподаватель
Сахалинский государственный университет
ул. Ленина, 290, Южно-Сахалинск, Россия, 693008
эл. почта: lkfed65@mail.ru
тел.: +79147652924

Мадудин Александр Иванович

генеральный директор
ООО «Нерест-2008»
ул. Советская, 60, кв. 1, Холмск, Сахалинская область,
Россия, 694620
эл. почта: ai_madudin@mail.ru
тел.: +79625813911

Skorobogatov, Mikhail

Tver State Technical University
22 Afanasi Nikitin emb., Tver, Russia

A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution,
Russian Academy of Sciences
33 Leninskii Ave., 119071 Moscow, Russia
e-mail: skorobogatov1@rambler.ru
tel.: +79109366948

Fyodorova, Lyudmila

Sakhalin State University
290 Lenin St., 693008 Yuzhno-Sakhalinsk, Russia
e-mail: lkfed65@mail.ru
tel: +79147652924

Madudin, Alexander

ООО "Nerest-2008"
60 Sovetskaya St., Apt. 1, 694620 Kholmsk, Sakhalin Region
e-mail: ai_madudin@mail.ru
tel.: +79625813911

УДК 606:582.232

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ УВЕЛИЧЕНИЯ БИОМАССЫ И ПРОДУКТОВ СИНТЕЗА У РОДОВ *SPIRULINA* И *ARTHROSPIRA* (СЯНООРНУТА) ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Д. И. Петрухина

Калужский государственный университет им. К. Э. Циолковского, Россия

Исследовали состав компонентов питательных сред для рекультивирования цианобактерий *Arthrospira platensis* и *Spirulina subsalsa* после их длительной криоконсервации. Оценивали биологические закономерности роста и биосинтетической активности цианобактерий (продукции биомассы, липидов, белка и сахаров, фенольных соединений) в присутствии различных макро- и микроэлементов. Добавление ретентата молочной сыворотки к разбавленной питательной среде Заррука способствует повышению прироста биомассы цианобактерий *A. platensis* (от 8,4 до 25,5 %) и *S. subsalsa* (от 5,2 до 28,7 %) после криоконсервации по сравнению с выращиванием без добавления ретентата. В данных условиях выращивания увеличивалось содержание фенольных соединений в биомассе цианобактерий: в 1,4–1,8 раза у *S. subsalsa* и в 1,8–2,4 раза у *A. platensis*. Содержание липидов варьировало в биомассе *S. subsalsa* с 9,67 до 15,39 %, *A. platensis* – с 11,01 до 13,01 % при применении оригинального либо модифицированного ретентата молочной сыворотки. Применение модифицированного ретентата молочной сыворотки позволило увеличить содержание общего белка и редуцирующих сахаров в биомассе *S. subsalsa* на 14,67 и 4,69 %, а *A. platensis* – на 11,99 и 9,16 % соответственно по сравнению с оригинальным ретентатом молочной сыворотки. Сделан вывод о том, что разбавленная среда Заррука с добавлением 2,0 % модифицированного либо оригинального ретентата сыворотки может использоваться для выращивания цианобактерий после криоконсервации.

Ключевые слова: цианобактерии; прирост биомассы; биосинтетическая активность; макро- и микроэлементы.

D. I. Petrukhina. ASSESSMENT OF THE POSSIBILITY OF AN INCREASE IN THE BIOMASS AND SYNTHESIS PRODUCTS OF *SPIRULINA* & *ARTHROSPIRA* (CYANOPHYTA) AFTER CRYOPRESERVATION

The composition of nutrient media for recultivation of cyanobacteria *Arthrospira platensis* and *Spirulina subsalsa* after their long-term cryopreservation was investigated. The effect of various macro- and microelements on cyanobacteria growth and biosynthetic activity (biomass production, phenolic compounds, lipids, protein and carbohydrate contents) was evaluated. The addition of whey retentate to diluted Zarrouk's medium promoted the increase in the biomass of *A. platensis* (8.4 vs. 25.5 %) & *S. subsalsa* (5.2 vs. 28.7 %) after cryopreservation compared to cultivation in diluted Zarrouk's medium without whey retentate. With these culture conditions, the content of phenolic compounds increased in both *S. subsalsa* (1.4–1.8-fold) and *A. platensis* (1.8–2.4-fold). The lipid content varied in *S. subsalsa* from 9.67 % to 15.39 % and in *A. platensis* from 11.01 to 13.01 % when

original or modified whey retentate were used. The application of modified whey retentate increased the content of total protein and carbohydrate by 14.67 and 4.69 % in *S. subsalsa* and by 11.99 and 9.16 % in *A. platensis*, respectively, compared to the results with original retentate. It was concluded that diluted Zarrouk's medium with the addition of 2.0 % of either modified or original whey retentate can be used for re-cultivation of cyanobacteria after cryopreservation.

Key words: cyanobacteria; biomass increment; biosynthetic activity; macro- and micronutrients.

Введение

Цианобактерии, в том числе *Spirulina* и *Arthrospira*, применяются в производстве пищевого белка, разнообразных лечебно-профилактических препаратов, высококачественных кормов для животных, пигментов и пищевых красителей, а также других востребованных продуктов для медицины, косметологии, животноводства и аквакультуры [Vonshak, 2002; Sili et al., 2012]. Представителей родов *Spirulina* и *Arthrospira* применяют для удаления нитратов, фосфора, аммония и мочевины из сточных вод [Converti et al., 2006; Mezzomo et al., 2010]. Эти цианобактерии исторически используются в питании человека, поскольку их биомасса содержит такие ценные соединения, как легкоусвояемые протеины, липиды, полисахариды, фенольные соединения, кроме того, имеет низкую калорийность и высокую биодоступность содержащихся в ней биологически активных компонентов [Koru, 2012]. В качестве корма для выращивания животных, в том числе рыб и беспозвоночных видов (например, гребешков), используется 30 % произведенной биомассы *Arthrospira* [Belay et al., 1996]. До недавнего времени интерес к *Spirulina* и *Arthrospira* ssp. основывался главным образом на пищевой ценности, однако они еще обладают высокой биологической активностью. Эта активность связана с содержанием в их составе компонентов, определяющих широкий спектр полезных свойств, таких как фикоцианин (синий пигмент), кальций-спирулан (сульфатированный полисахарид), циановирин-N и сульфолипиды. Хотя биомасса данных цианобактерий используется во всем мире прежде всего для извлечения компонентов с антиоксидантными свойствами, она также может применяться как сырье для биотоплива [Markou et al., 2013; Vieira Salla et al., 2016; Chen et al., 2018]. Представители родов *Spirulina* и *Arthrospira* благодаря возможности их относительно простого и безопасного культивирования выращиваются в промышленных масштабах во многих странах мира [Eriksen, 2008].

Одним из первых подробное исследование условий роста цианобактерии *Arthrospira* sp. провел Клод Заррук (Claude Zarrouk) в своей диссертационной работе. Питательная среда, разработанная Зарруком, стала стандартной средой для выращивания цианобактерий родов *Arthrospira* и *Spirulina* [Vonshak, 2002; Eriksen, 2008; Sili et al., 2012]. Представляется интересным возможное повторное использование питательной среды Заррука после выращивания на ней культур *Arthrospira* sp. и *Spirulina* sp., поскольку применение этой многокомпонентной среды для культивирования цианобактерий в больших объемах финансово затратно [Raouf et al., 2006; Madkour et al., 2012].

Эксперименты по выращиванию водорослей в «отработанных» питательных средах ведутся в последнее время недостаточно [Loftus, Johnson, 2017] и представлены лишь в нескольких работах Morocho-Jácome с соавт. [2016a, b]. Показано, что потребление цианобактериями основных питательных веществ из жидкой питательной среды Заррука обычно неполное, то есть после выращивания и отделения биомассы этих цианобактерий в культуральной среде присутствуют остаточные концентрации нитратов, фосфатов и карбонатов [Morocho-Jácome et al., 2016a, b]. Это позволяет провести лишь частичное их восполнение в питательной среде Заррука для ее повторного использования, например, для рекультивирования *Arthrospira* sp. и *Spirulina* sp. после длительной криоконсервации.

Ранее было показано, что миксотрофное культивирование в присутствии разных органических соединений, например, глюкозы, этанола и уксусной кислоты, приводит к повышению значения конечной концентрации биомассы цианобактерий [Golmakani et al., 2012]. Молочная сыворотка имеет высокое содержание органических соединений (в основном лактозы, а также L- и D-лактата, D-галактозы) и является основным и недорогим побочным продуктом, который образуется в процессе переработки молочного сырья [Vieira Salla et al., 2016], в связи с чем ее применение при культивировании

микроорганизмов экономически целесообразно. Кроме того, использование побочных продуктов, которые часто классифицируются как «отходы», для выращивания микроорганизмов может способствовать снижению затрат производства на их утилизацию.

Рост цианобактерий и состав их биомассы находятся в зависимости от многих факторов, наиболее важный из которых – это доступность питательных веществ, содержащихся в среде для культивирования [Olguín et al., 2001; Margarites, Costa, 2014]. Согласно литературным данным, выращивание цианобактерий на стандартной питательной среде Заррука, содержащей молочную сыворотку, способствует повышению прироста биомассы этих культур, а значит, и ценных продуктов, получаемых из их биомассы [Joshi et al., 2014; Vieira Salla et al., 2016]. Было выдвинуто предположение, что добавление молочной сыворотки к питательной среде для выращивания цианобактерий родов *Spirulina* и *Arthrospira* может повысить эффективность рекультивирования этих микроорганизмов после криоконсервации. Представлялось интересным также оценить влияние применения ретентата молочной сыворотки для обогащения разбавленной питательной среды Заррука на содержание белков, липидов, сахаров и фенольных соединений у рекультивированных после криоконсервации культур цианобактерий родов *Spirulina* и *Arthrospira*.

Материалы и методы

Опыты проводили с двумя видами цианобактерий *Spirulina subsalsa* PCC 9445 и *Arthrospira platensis* PCC 9223 из коллекции культур университета Пастера, Франция. Исходные культуры *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 выращивали на жидкой питательной среде в автоклавированных конических стеклянных колбах Эрленмейера объемом 100 мл, с широким горлышком, с пробками из целлюлозной массы. Питательную среду Заррука стерилизовали фильтрованием через стерильный фильтр из ацетата целлюлозы (диаметр пор 0,45 мкм). Цианобактерии культивировали при температуре 30 °С в инкубаторе Minitron (фирма Infors HT, Швейцария) с постоянным перемешиванием с помощью встроенного орбитального шейкера диаметром качания 25 мм. Частота вращения составляла 110 об/мин. Освещение обеспечивали шестью люминесцентными лампами GroLux 15W (фирма Osram Sylvania, США), которые располагались над колбами на высоте 40 см, обеспечивая среднюю интенсивность света на поверхности клеточной суспензии

21 мкмоль/(м²с). Выращивание цианей осуществляли с 16-часовым фотоциклом.

После 12 дней культивирования питательную среду удаляли в стерильных условиях, а биомассу промывали стерильной дистиллированной водой. Отмытую биомассу в количестве 0,9 мл помещали в полипропиленовые криофлаконы объемом 2 мл с завинчивающейся крышкой. Затем в эти же криофлаконы в качестве криопротектора добавляли одновременно стерильный раствор ДМСО в качестве криопротектора в двойной концентрации (20 %) до отметки общего объема в 1,8 мл. После этого криофлаконы выдерживали 10 мин в темноте при постоянном перемешивании на ротаторе со скоростью 20 об/мин.

После инкубирования с криопротекторами в темноте криофлаконы с биомассой помещали в полимерный контейнер для замораживания (Mr. Frosty, Nalgene, США), который был предварительно охлажден до 4 °С в течение минимум 5 часов. Данный контейнер обеспечивает воспроизводимую скорость охлаждения минус 1 °С в минуту. Контейнер Mr. Frosty с криофлаконами помещали в морозильную камеру, в которой поддерживалась постоянная температура минус 80 °С. Через 1,5 часа криофлаконы с цианеями перемещали из контейнера Mr. Frosty™ в пластиковые боксы и продолжали хранить 12 месяцев при температуре минус 80 °С.

Для размораживания криофлаконы с цианеями извлекали из морозильной камеры и переносили на водяную баню с температурой воды 37 °С, где выдерживали до исчезновения льда. После размораживания содержимое криофлакона переносили в стерильную колбу Эрленмейера с 10 мл питательной среды. Затем колбы Эрленмейера с цианеями инкубировали как исходные культуры.

Исходные культуры цианобактерий выращивали на питательной среде Заррука с pH от 9,1 до 9,6. Питательная среда Заррука использовалась в модификации от коллекции водорослей университета Гёттенгена, Германия (*Spirulina* Medium (=Spirul.)) (табл. 1.)

Представлялось интересным определить возможность использования разбавленной питательной среды Заррука (табл. 1.) для рекультивирования цианобактерий после криоконсервации. Разбавленная среда была получена путем добавления к стандартной питательной среде Заррука равного объема культуральной среды, оставшейся после выращивания на ней биомассы цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445, которую использовали для криоконсервации.

Для обогащения разбавленной среды Заррука использовали ретентат молочной сыворотки (рН 4,80, плотность 1,080 г/см³). После обогащения разбавленная (1:1) питательная среда Заррука содержала 2 % ретентата молочной сыворотки. Был применен оригинальный ретентат и модифицированный (табл. 2.).

Повторность в пределах одного варианта опыта с питательной средой – пятикратная. Каждый опыт повторяли три раза. На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. В статье обсуждаются величины, достоверные при $p < 0,05$.

В биомассе цианобактерий, культивируемых после криоконсервации, определяли содержание редуцирующих (восстанавливающих) сахаров (методом Миллера) [Miller, 1959], суммарного количества липидов (методом, основанным на реакции с сульфопосфорованилиновым реактивом) [Zöllner, Kirsch, 1962; Knight et al., 1972] и суммарного количества белка (методом Бредфорда) [Bradford, 1976]. Такие достаточно старые методические приемы были применены для эффективности проводимых исследований, верной интерпретации результатов и сравнения с данными других авторов, использующих такие же методы [Olguín et al., 2001; Raouf et al., 2006; Madkour et al., 2012; Markou et al., 2013; Margarites, Costa, 2014; Vieira Salla et al., 2016; Chen et al., 2018].

Определение общего содержания (суммы) фенольных соединений в экстракте цианобактерий проводили стандартным методом с применением реактива Фолина – Чокальтеу, как описано в работах Синглтона и соавт. [Singleton, Rossi, 1965; Singleton et al., 1999].

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что использование разбавленной (1:1) среды Заррука не влияло на жизнеспособность и рост штаммов после криоконсервации цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 (табл. 3).

Так, у исследуемых штаммов *A. platensis* и *S. subsalsa* после оттаивания наблюдали рост клеток этих нитевидных цианобактерий (трихом) на разбавленной среде Заррука, а прирост биомассы составил 78,25 и 93,5 % соответственно по сравнению с этим показателем у цианобактерий, выращенных на стандартной питательной среде Заррука. Таким образом, полученные данные говорят о возможности применения для рекультивирования исследуемых цианобактерий после криоконсервации разбавленной среды Заррука. Разбавление

Таблица 1. Состав среды Заррука

Table 1. Composition of Zarrouk's medium

Компонент Components	Содержание Content
NaHCO ₃	13,61 г (g)
Na ₂ CO ₃	4,03 г (g)
K ₂ HPO ₄	0,50 г (g)
NaNO ₃	2,50 г (g)
K ₂ SO ₄	1,00 г (g)
NaCl	1,00 г (g)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20 г (g)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,04 г (g)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 г (g)
Na ₂ ЭДТА	0,08 г (g)
раствор микроэлементов* micronutrient solution*	5 мл (ml)
вода дистиллированная distilled water	до 1 литра up to 1 liter

*Раствор микроэлементов для питательной среды Заррука

*Micronutrient solution for Zarrouk's medium

Компонент Components	Первичный раствор [г/ 100 мл] Stock solution [g/ 100 ml]	Добавление в раствор микроэлементов Applied solution
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,10	1 мл (ml)
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,10	2 мл (ml)
H ₃ BO ₃	0,20	5 мл (ml)
Co (NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,02	5 мл (ml)
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,02	5 мл (ml)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0005	1 мл (ml)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	0,7 г (ml)
Na ₂ ЭДТА	-	0,8 г (g)
вода дистиллированная distilled water	-	до 1 литра up to 1 liter

Таблица 2. Состав оригинального и модифицированного ретентата молочной сыворотки

Table 2. Composition of whey retentate (original and modified)

Компоненты Components	Ретентат молочной сыворотки, мг/л Retentate of whey, mg/L	
	Оригинальный Original	Модифицированный Modified
NH ₄ -N	290	4610
ortho-PO ₄ -P	2150	2130
K	5320	6180
Na	5100	5800
S	147	4400
Ca	2330	2640
Mg	380	414
Zn	11,7	38
Fe	<0,4	21,7
Cu	<0,8	5,5
Mn	<0,4	5,3

Таблица 3. Прирост биомассы у цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации

Table 3. Final biomass concentrations of *A. platensis* PCC 9223 and *S. subsalsa* PCC 9445 after cryostorage

Питательная среда Заррука Zarrouk's medium	Прирост биомассы цианобактерий, г/л Final biomass concentrations, g/L	
	<i>S. subsalsa</i> PCC 9445	<i>A. platensis</i> PCC 9223
Разбавленная Diluted medium	0,633 ± 0,008	0,903 ± 0,001
Стандартная Complete medium	0,677 ± 0,002	1,154 ± 0,002

среды Заррука не только снижает стоимость питательной среды для выращивания *Spirulina* sp. и *Arthrospira* sp., но добавление культуральной среды после выращивания цианобактерий уменьшает также количество отходов, утилизируемых в окружающую среду.

Тем не менее, несмотря на эффективность применения разбавленной среды Заррука, в экспериментах наблюдается некоторое снижение прироста биомассы цианобактерий после криоконсервации. Поэтому представлялось целесообразным исследовать возможность оптимизации разбавленной среды Заррука путем внесения дополнительных соединений.

В дальнейших экспериментах по рекультивированию цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации использовали разбавленную питательную среду Заррука, то есть среду с дефицитом питательных веществ, обогащенную ретентатом молочной сыворотки (2 %).

Ретентат молочной сыворотки являлся продуктом ультрафильтрации кислой сыворотки с последующим обратным осмосом ультрафильтрационного пермеата. С целью определения возможности влияния молочной сыворотки в среде на эффективность рекультивирования криоконсервированные культуры *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 сразу после оттаивания выращивали на двух вариантах питательной среды, обогащенных оригинальным либо модифицированным ретентатом молочной сыворотки. Оригинальный ретентат помимо высокого содержания белка имел 290 мг/л общего аммонийного азота, 414 мг/л магния, а также высокое содержание кальция, калия и натрия. Модифицированный ретентат был дополнительно обогащен аммонийным азотом до 4610 мг/л и содержал больше биологически значимых элементов, таких как Zn, Fe, Cu, Mn, для компенсации их возможного дефицита в разбавленной питательной среде Заррука.

Результаты исследования показали, что добавление ретентата молочной сыворотки к разбавленной питательной среде Заррука способствует повышению прироста биомассы цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 (от 8,4 до 25,5 %) и *S. subsalsa* PCC 9445 (от 5,2 до 28,7 %) после криоконсервации по сравнению с выращиванием без добавления ретентата, т. е. с контрольной культурой (рис. 1).

Полученные результаты исследования позволяют считать, что повышение прироста биомассы цианобактерий после криоконсервации связано с питательными веществами, которые содержит ретентат молочной сыворотки. Причем наибольшие показатели были получены при применении модифицированного ретентата молочной сыворотки по сравнению с культурами цианобактерий, выращенными после криоконсервации на разбавленной питательной среде Заррука без добавления ретентата. Можно предположить, что полученные результаты связаны с составом используемого в нашей работе модифицированного ретентата молочной сыворотки, который отличался повышенным содержанием азота и большим содержанием биологически значимых ионов металлов (Zn, Fe, Cu, Mn).

Такое предположение подтверждается исследованиями авторов о том, что питательные

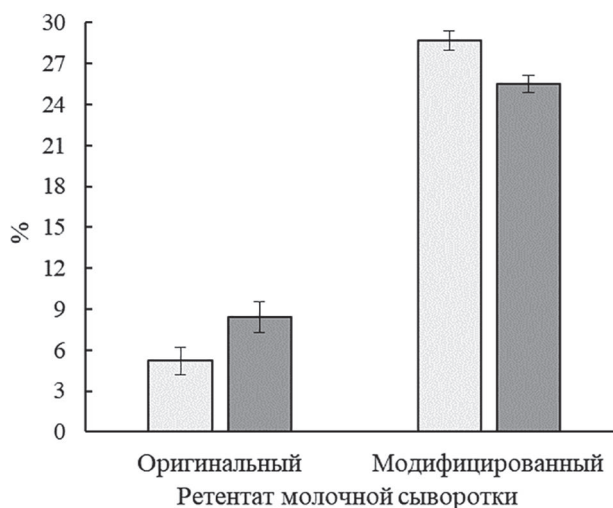


Рис. 1. Прирост биомассы цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации (% от контрольной культуры. В качестве контрольной выступала разбавленная питательная среда Заррука)

Fig. 1. Final biomass concentrations of *A. platensis* PCC 9223 and *S. subsalsa* PCC 9445 after cryostorage (% in comparison with control culture. The control – diluted Zarrouk's medium)

соединения молочной сыворотки усваиваются цианобактериями рода *Arthrospira*. Ранее выявлено, что цианобактерии растут на сточных водах завода по переработке молока (при разбавлении до 30 % с добавлением NaHCO_3 (16 г/л)) [Chang et al., 2013]. Также было показано, что при выращивании цианобактерий на подсырной сыворотке их биомасса увеличилась на 40–97 % [Cantú-Lozano et al., 2013].

В наиболее близкой к нашему исследованию работе [Vieira Salla et al., 2016] цианобактерию *A. platensis* выращивали на разбавленной дистиллированной водой среде Заррука (20- и 30%-й) с добавлением ретентата молочной сыворотки в концентрациях 1,25 и 2,5 %. Однако в статье показано, что замена стандартной среды Заррука на разбавленную (20- и 30%-ю) с добавлением ретентата молочной сыворотки не влияет на рост цианобактерии. Авторы отмечают, что достигли идентичной конечной концентрации клеток на стандартной среде Заррука и разбавленной с добавлением с 2,5 % ретентата молочной сыворотки. Такие данные можно объяснить тем, что в отличие от ретентатов (оригинального и модифицированного), используемых в данной работе, ретентат молочной сыворотки, используемый в работе Vieira Salla с соавт. [2016], имел высокое содержание лактозы (7,18 %), но меньшее содержание магния (118,20 мг/л) и общего аммонийного азота (107,10 мг/л).

Полученные нами данные показали, что обогащение питательной среды Заррука ретентатом молочной сыворотки способствует увеличению содержания суммарного количества белка, редуцирующих сахаров и общих липидов в биомассе *A. platensis* PCC 9223 (рис. 2, б) и *S. subsalsa* PCC 9445 (рис. 2, а), рекультивированных после криоконсервации. Это может быть связано с повышением эффективности фотосинтеза цианобактерий благодаря присутствию в питательной среде ретентата молочной сыворотки, который имеет высокое содержание магния.

Так, при добавлении оригинального ретентата молочной сыворотки в биомассе цианобактерий было следующее содержание белка и сахаров: у *S. subsalsa* PCC 9445 – 35,47 и 17,22 %, а у *A. platensis* PCC 9223 – 32,22 и 23,23 % соответственно. При использовании модифицированного ретентата в биомассе *S. subsalsa* PCC 9445 содержание белка и сахаров было еще выше и составило 41,35 и 27,25 %, а в биомассе *A. platensis* PCC 9223 – 37,23 и 39,43 % соответственно. Содержание липидов варьировало в биомассе *S. subsalsa* PCC 9445 с 9,67 до 15,39 %, *A. platensis* PCC 9223 – с 11,01 до

13,01 % при применении оригинального либо модифицированного ретентата молочной сыворотки.

Результаты исследования также показали различия между изучаемыми видами цианобактерий. Так, цианобактерия *S. subsalsa* PCC 9445 была более чувствительна к применению среды, обогащенной ретентатом молочной сыворотки после криоконсервации (рис. 2, а). Это может быть связано с отзывчивостью штамма, его особенностями, в том числе видовыми. Таким образом, применение для обогащения разбавленной питательной среды Заррука модифицированного ретентата молочной сыворотки позволило увеличить содержание общего белка и редуцирующих сахаров в биомассе *S. subsalsa* PCC 9445 на 14,67 и 4,69 % соответственно по сравнению с применением оригинального ретентата молочной сыворотки (рис. 2, а). Содержание общего белка и редуцирующих сахаров в биомассе *A. platensis* PCC 9223, выращенной после криоконсервации в присутствии модифицированного ретентата молочной сыворотки, было выше на 11,99 и 9,16 % соответственно по сравнению с выращенной в присутствии оригинального ретентата молочной сыворотки (рис. 2, б).

Наши данные согласуются с результатами исследования Chang и соавт. [2013], в котором в биомассе цианобактерии *A. maxima*, выращенной на разбавленной до 30 % сточной воде завода по переработке молока, содержалось 65,2 % белка, 11,3 % сахаров и 7,0 % липидов, тогда как биомасса этой цианобактерии, выращенная на минеральной среде, имела 72,5 % белка, 8,3 % сахаров и 6,3 % липидов.

В то же время в статье Vieira Salla с соавт. [2016] приводятся данные о том, что добавление ретентата в стандартную питательную среду Заррука не влияло на содержание в биомассе белка и сахаров, а при культивировании цианобактерий на разбавленной до 20 % питательной среде и добавлении 2,5 % ретентата молочной сыворотки происходило снижение содержания в биомассе белка (26,44 %) и увеличение содержания сахаров (на 17,24 %). Авторы связывают полученные результаты с содержанием лактозы в ретентате молочной сыворотки, которая, сама являясь сахаром, может повлиять на содержание сахаров и липидов в биомассе цианобактерий, а также разбавлением питательной среды Заррука, что привело к ограничению азота и перенаправлению фотоассимилированного углерода на синтез углеводов вместо белков и пигментов [Vieira Salla et al., 2016].

Более высокое содержание белка и пигментов в биомассе цианобактерий фиксируется в условиях достаточного количества азота в пи-

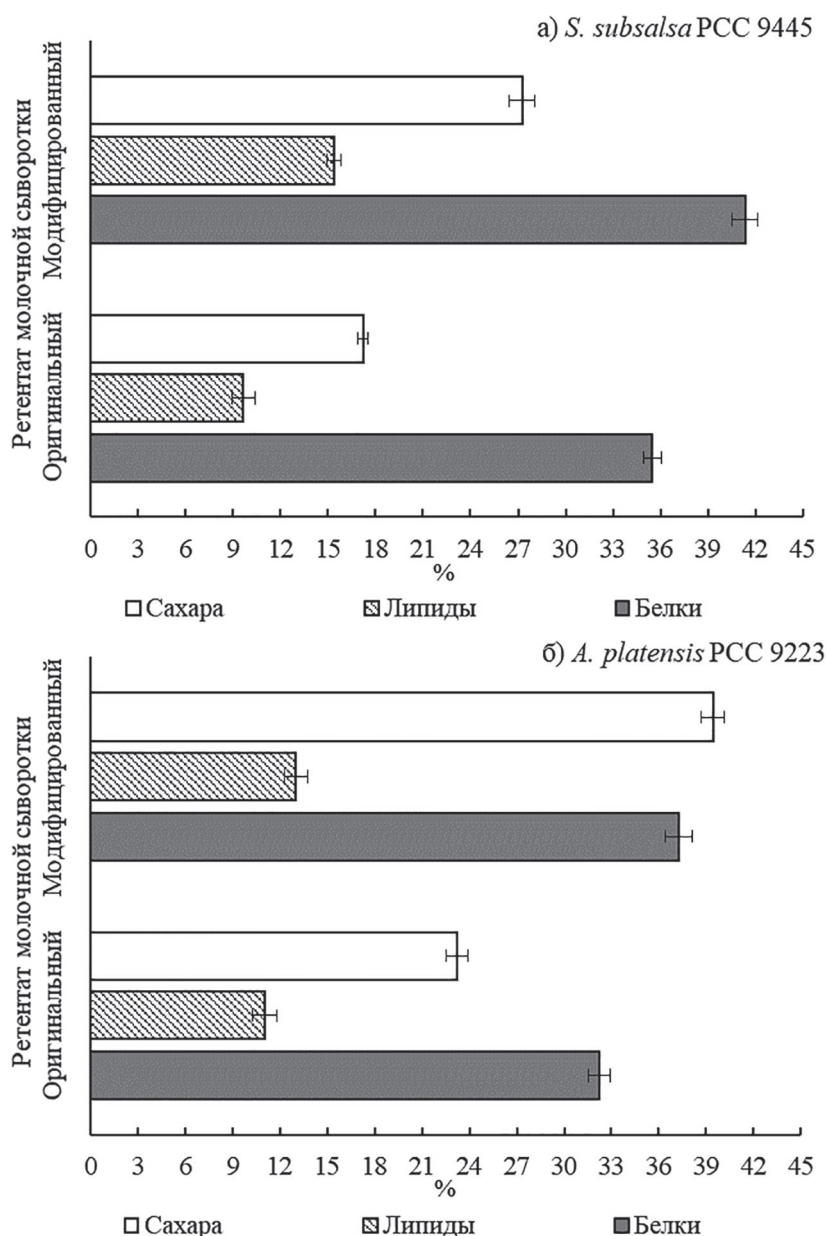


Рис. 2. Содержание суммарного количества белка, редуцирующих сахаров и общих липидов (%) в биомассе *S. subsalsa* PCC 9445 (а) и *A. platensis* PCC 9223 (б), выращенной после криоконсервации в присутствии ретендата молочной сыворотки (по сравнению с культивацией без добавления ретендата)

Fig. 2. Contents of total protein amount, reducing sugars and total lipids (%) in biomass of *S. subsalsa* PCC 9445 (а) & *A. platensis* PCC 9223 (б), grown after cryostorage in the presence of whey retentate (in comparison to cultivation without retentate of whey)

тательной среде. Сохранить высокое содержание белка в биомассе цианобактерий после криоконсервации представлялось крайне важным, поскольку целью является производство биомассы цианобактерий с высоким содержанием продуктов синтеза, то есть с высокими питательными характеристиками. В нашем исследовании сохранение высокого содержа-

ния белка в биомассе рекультивированных цианобактерий свидетельствует о достаточном содержании азота в исследуемых питательных средах, что достигалось благодаря применению модифицированного ретендата молочной сыворотки.

Также помимо сахаров, белков и липидов представлялось важным определить влияние

Таблица 4. Содержание фенольных соединений в биомассе цианобактерий

Table 4. Phenolic compounds content in biomass

Ретентат молочной сыворотки Retentate of whey	Фенольные соединения (мг/г биомассы цианобактерий) Phenolic compounds (mg/g of biomass)	
	<i>S. subsalsa</i> PCC 9445	<i>A. platensis</i> PCC 9223
Без ретентата (разбавленная среда Заррука) Without retentate of whey (diluted Zarrouk's medium)	2,17 ± 0,23	1,34 ± 0,15
Оригинальный Original	3,11 ± 0,22	2,41 ± 0,25
Модифицированный Modified	3,93 ± 0,20	3,28 ± 0,27

добавления к питательной среде Заррука ретентата молочной сыворотки на содержание фенольных соединений в биомассе *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации. Фенольные соединения, помимо того что являются антиоксидантами, что крайне важно для спирулины как пищевой добавки, могут способствовать увеличению срока хранения биомассы спирулины как продукта. Добавление к разбавленной питательной среде Заррука ретентата молочной сыворотки привело к повышению выработки фенольных соединений в биомассе цианобактерий (табл. 4). Так, добавление ретентата к культивируемой среде в 1,4–1,8 раза увеличило содержание фенольных соединений в биомассе *S. subsalsa* и в 1,8–2,4 раза у *A. platensis*.

Однако в отличие от сахаров, липидов и белков использование модифицированного ретентата молочной сыворотки более значительно повлияло на содержание фенольных соединений в биомассе цианобактерий после криоконсервации в сравнении с культурами, выращенными в присутствии оригинального ретентата молочной сыворотки. При использовании модифицированного состава ретентата молочной сыворотки биомасса цианобактерий после криоконсервации имеет более высокие количественные значения содержащихся фенольных соединений по сравнению с этими значениями в культуре цианобактерий, выращенной с оригинальным ретентатом молочной сыворотки (на 26,36 и 36,00 % для *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 соответственно). Эти результаты можно объяснить более высоким содержанием азота в среде с добавлением модифицированного ретентата молочной сыворотки, так как азот, необходимый для синтеза ароматических аминокислот, может играть важную роль в биосинтезе фенольных соединений. Полученные данные подтверждают работы исследователей, в которых показано положительное влияние концентрации азота

в питательной среде на содержание фенольных соединений в биомассе цианобактерий рода *Arthrospira* [Colla et al., 2007a, b; Abd El-Baky et al., 2009].

Заключение

Таким образом, результаты нашего исследования показали возможность применения для рекультивирования исследуемых цианобактерий после криоконсервации разбавленной (1:1) среды Заррука, используемой при рекультивировании цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации. Полученные данные подтвердили эффективность применения ретентата молочной сыворотки для обогащения среды Заррука при рекультивировании цианобактерий *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации. Было показано, что выращивание цианобактерий после криоконсервации на разбавленной среде Заррука с добавлением ретентата молочной сыворотки способствовало увеличению содержания таких важных соединений, как редуцирующие сахара, липиды, белок, а также фенольных соединений в биомассе цианобактерий. При этом наибольшее увеличение концентрации указанных соединений в биомассе цианобактерий можно получить за счет использования модифицированного ретентата молочной сыворотки, что объясняется повышенным содержанием азота (до 4610 мг/л) и большим содержанием биологически значимых элементов, таких как Zn, Fe, Cu, Mn.

Полученные результаты применения питательной среды, обогащенной ретентатом молочной сыворотки, могут также указывать на антистрессовый эффект, вероятно, за счет содержащихся в такой среде компонентов, по отношению к рекультивируемым цианобактериям. Возможно, выращивание цианобактерий сразу после оттаивания на питательной

среде с молочной сывороткой помогает клеткам этих микроорганизмов восстанавливаться после криоконсервации. Поскольку, согласно литературным данным, для ряда бактерий стресс после криоконсервации сохраняется в течение нескольких делений.

Следует также отметить и значительную экономическую выгоду от использования разбавленной (в два раза) питательной среды Заррука с добавлением в эту среду молочной сыворотки, недорогого побочного продукта молочной промышленности, снижающего стоимость среды при высокой эффективности рекультивирования цианобактерий после криоконсервации с повышением содержания белков, сахаров, липидов и фенольных соединений в биомассе.

Работа поддержана стипендией Президента Российской Федерации для обучения за рубежом аспирантов российских вузов, стипендией MULTIC от международной стипендиальной программы ERASMUS MUNDUS Action 2 и стипендией Дрезденского технического университета для развития научной карьеры у женщин (Scholarship Program for the Promotion of Early-Career Female Scientists of TU Dresden).

Литература

Abd El-Baky H. H. A., El Baz F. K., El-Baroty G. S. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects // Afr. J. Biotechnol. 2009. Vol. 8, no. 24. P. 7059–7067.

Belay A., Kato T., Ota Y. *Spirulina* (*Arthrospira*): potential application as an animal feed supplement // J. Appl. Phycol. 1996. Vol. 8, no. 4–5. P. 303–311. doi: 10.1007/BF02178573

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72, no. 1–2. P. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Cantú-Lozano D., Molina-Quintero M., Del Bianchi V. L. Organic load removal of cheese whey in a photobioreactor of rotating disks with *Spirulina platensis* // Poster presented at XVII National Congress of Biotechnology and Bioengineering. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A. C. (Cancun, June, 23–28, 2013). Cancun, Mexico, 2013.

Chang W. T., Lee M., Den W. Simultaneous carbon capture, biomass production, and dairy wastewater purification by *Spirulina maxima* photobioreaction // Ind. Eng. Chem. Res. 2013. Vol. 52, no. 5. P. 2046–2055. doi: 10.1021/ie301932v

Chen Zh., Wang L., Qiu Sh., Ge Sh. Determination of microalgal lipid content and fatty acid for biofuel production // BioMed Res. Int. 2018. Vol. 2018. 17 p. doi: 10.1155/2018/1503126

Colla L. M., Furlong E. B., Vieira Costa J. A. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*

cultivated under different temperatures and nitrogen regimes // Braz. Arch. Biol. Tech. 2007a. Vol. 50, no. 1. P. 161–167. doi: 10.1590/S1516-89132007000100020

Colla L. M., Reinehr Ch. O., Reichert C., Vieira Costa J. A. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes // Bioresource Tech. 2007b. Vol. 98. P. 1489–1493. doi: 10.1016/j.biortech.2005.09.030

Converti A., Scapazzoni S., Lodi A., Carvalho J. C. M. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2006. Vol. 33, no. 1. P. 8–16. doi: 10.1007/s10295-005-0025-8

Eriksen N. T. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 80, no. 1. P. 1–14. doi: 10.1007/s00253-008-1542-y

Golmakani M.-T., Rezaei K., Mazidi S., Razavi S. H. Effect of alternative C₂ carbon sources on the growth, lipid, and γ -linolenic acid production of spirulina (*Arthrospira platensis*) // Food Sci. Biotechnol. 2012. Vol. 21, no. 2. P. 355–363. doi: 10.1007/s10068-012-0047-8

Joshi M., Kaur K., Mishra T., Singh S. To evaluate Lab-scale Cultivation of *Spirulina* by using different substrates and to evaluate its chlorophyll and protein content // Int. Res. J. Biol. Sci. 2014. Vol. 3, no. 1. P. 22–30.

Knight J. A., Anderson S., Rawle J. M. Chemical basis of the sulfo-phosphovanillin reaction for estimating total serum lipids // Clinical Chem. 1972. Vol. 18, no. 3. P. 199–202.

Koru E. Earth Food *Spirulina* (*Arthrospira*): Production and quality standards // Food Additive. 2012. P. 191–202. doi: 10.5772/31848

Loftus S. E., Johnson Z. I. Cross-study analysis of factors affecting algae cultivation in recycled medium for biofuel production // Algal Res. 2017. Vol. 24, pt. A. P. 154–166. doi: 10.1016/j.algal.2017.03.007

Madkour F. F., Kamil A. El-W., Nasr H. S. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media // Egypt. J. Aquatic Res. 2012. Vol. 38. P. 51–57. doi: 10.1016/j.ejar.2012.09.003

Margarites A. C. F., Costa J. A. V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production // Int. J. Eng. Res. Appl. 2014. Vol. 4, no. 11 (ver. 3). P. 80–86.

Markou G., Angelidaki I., Nerantzis E., Georgakakis D. Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* // Energies. 2013. Vol. 6. P. 3937–3950. doi: 10.3390/en6083937

Mezzomo N., Saggiorato A. G., Siebert R., Tatsch P. O., Lago M. C., Hemkemeier M., Costa J. A. V., Bertolin T. E., Colla L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater // Ciência e tecnologia de alimentos. 2010. Vol. 30, no. 1. P. 173–178. doi: 10.1590/S0101-20612010000100026

Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Anal. Chem. 1959. Vol. 31. P. 426–428. doi: 10.1021/ac60147a030

Morocho-Jácome A. L., Mascioli G. F., Sato S., de Carvalho J. C. M. Evaluation of physicochemical treatment conditions for the reuse of a spent growth medium in *Arthrospira platensis* cultivation

// Algal Res. 2016a. Vol. 13. P. 159–166. doi: /10.1016/j.algal.2015.11.022

Morocho-Jácome A. L., Sato S., de Carvalho J. C. M. Ferric sulfate coagulation and powdered activated carbon adsorption as simultaneous treatment to reuse the medium in *Arthrospira platensis* cultivation // J. Chem. Technol. Biot. 2016b. Vol. 91, no. 4. P. 901–910. doi: 10.1002/jctb.4655

Olguín E., Galicia S., Angulo-Guerrero O. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste // Bioresource Technol. 2001. Vol. 77. P. 19–24. doi: 10.1016/S0960-8524(00)00142-5

Raouf B., Kaushik B. D., Prasanna R. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina* // Biomass and Bioenergy. 2006. Vol. 30. P. 537–542. doi: 10.1016/j.biombioe.2005.09.006

Sili C., Torzillo G., Vonshak A. *Arthrospira* (*Spirulina*). Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time / Ed. B. Whitton. New York; London: Springer Dordrecht Heidelberg, 2012. P. 677–705. doi: 10.1007/978-94-007-3855-3_25

Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocal-

teu reagent // Methods in Enzymology. Academic Press, 1999. Vol. 299. P. 152–178. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Singleton V. L., Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents // Am. J. Enol. Vitic. 1965. Vol. 16. P. 144–153.

Vieira Salla A. C., Margarites A. C., Seibel F. I., Holz L. C., Brião V. B., Bertolin T. E., Colla L. M., Vieira Costa J. A. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate // Bioresource Technol. 2016. Vol. 209. P. 133–141. doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.069

Vonshak A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology. London: CRC Press, 2002. 252 p.

Zöllner N., Kirsch K. Z. Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulphosphovanillin-Reaktion // Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin. 1962. Vol. 135, no. 6. P. 545–561.

Поступила в редакцию 10.09.2018

References

Abd El-Baky H. H. A., El Baz F. K., El-Baroty G. S. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects. *Afr. J. Biotechnol.* 2009. Vol. 8, no. 24. P. 7059–7067.

Belay A., Kato T., Ota Y. *Spirulina* (*Arthrospira*): potential application as an animal feed supplement. *J. Appl. Phycol.* 1996. Vol. 8, no. 4–5. P. 303–311. doi: 10.1007/BF02178573

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72, no. 1–2. P. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Cantú-Lozano D., Molina-Quintero M., Del Banchi V. L. Organic load removal of cheese whey in a photobioreactor of rotating disks with *Spirulina platensis*. Poster presented at XVII National Congress of Biotechnology and Bioengineering. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A. C. (Cancun, June, 23–28, 2013). Cancun, Mexico, 2013.

Chang W. T., Lee M., Den W. Simultaneous carbon capture, biomass production, and dairy wastewater purification by *Spirulina maxima* photobioreaction. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2013. Vol. 52, no. 5. P. 2046–2055. doi: 10.1021/ie301932v

Chen Zh., Wang L., Qiu Sh., Ge Sh. Determination of microalgal lipid content and fatty acid for biofuel production. *BioMed Res. Int.* 2018. Vol. 2018. 17 p. doi: 10.1155/2018/1503126

Colla L. M., Furlong E. B., Vieira Costa J. A. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Braz. Arch. Biol. Tech.* 2007a. Vol. 50, no. 1. P. 161–167. doi: 10.1590/S1516-89132007000100020

Colla L. M., Reinehr Ch. O., Reichert C., Vieira Costa J. A. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Tech.* 2007b. Vol. 98. P. 1489–1493. doi: 10.1016/j.biortech.2005.09.030

Converti A., Scapazzoni S., Lodi A., Carvalho J. C. M. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006. Vol. 33, no. 1. P. 8–16. doi: 10.1007/s10295-005-0025-8

Eriksen N. T. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. Vol. 80, no. 1. P. 1–14. doi: 10.1007/s00253-008-1542-y

Golmakani M.-T., Rezaei K., Mazidi S., Razavi S. H. Effect of alternative C₂ carbon sources on the growth, lipid, and γ -linolenic acid production of *spirulina* (*Arthrospira platensis*). *Food Sci. Biotechnol.* 2012. Vol. 21, no. 2. P. 355–363. doi: 10.1007/s10068-012-0047-8

Joshi M., Kaur K., Mishra T., Singh S. To evaluate Lab-scale Cultivation of *Spirulina* by using different substrates and to evaluate its chlorophyll and protein content. *Int. Res. J. Biol. Sci.* 2014. Vol. 3, no. 1. P. 1–9.

Knight J. A., Anderson S., Rawle J. M. Chemical basis of the sulfo-phosphovanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clinical Chem.* 1972. Vol. 18, no. 3. P. 199–202.

Koru E. Earth Food *Spirulina* (*Arthrospira*): Production and quality standards. *Food Additive.* 2012. P. 191–202. doi: 10.5772/31848

Loftus S. E., Johnson Z. I. Cross-study analysis of factors affecting algae cultivation in recycled medium for biofuel production. *Algal Res.* 2017. Vol. 24, pt A. P. 154–166. doi: 10.1016/j.algal.2017.03.007

Madkour F. F., Kamil A. El-W., Nasr H. S. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egypt. J. Aquatic Res.* 2012. Vol. 38. P. 51–57. doi: 10.1016/j.ejar.2012.09.003

Margarites A. C. F., Costa J. A. V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. *Int. J. Eng. Res. Appl.* 2014. Vol. 4, no. 11 (ver. 3). P. 80–86.

Markou G., Angelidaki I., Nerantzis E., Georgakakis D. Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *Energies*. 2013. Vol. 6. P. 3937–3950. doi: 10.3390/en6083937

Mezzomo N., Saggiorato A. G., Siebert R., Tatsch P. O., Lago M. C., Hemkemeier M., Costa J. A. V., Bertolin T. E., Colla L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. *Ciência e tecnologia de alimentos*. 2010. Vol. 30, no. 1. P. 173–178. doi: 10.1590/S0101-20612010000100026

Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 1959. Vol. 31. P. 426–428. doi: 10.1021/ac60147a030

Morocho-Jácome A. L., Mascioli G. F., Sato S., de Carvalho J. C. M. Evaluation of physicochemical treatment conditions for the reuse of a spent growth medium in *Arthrospira platensis* cultivation. *Algal Res.* 2016a. Vol. 13. P. 159–166. doi: 10.1016/j.algal.2015.11.022

Morocho-Jácome A. L., Sato S., de Carvalho J. C. M. Ferric sulfate coagulation and powdered activated carbon adsorption as simultaneous treatment to reuse the medium in *Arthrospira platensis* cultivation. *J. Chem. Technol. Biot.* 2016b. Vol. 91, no. 4. P. 901–910. doi: 10.1002/jctb.4655

Olguín E., Galicia S., Angulo-Guerrero O. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on di-

gested pig waste. *Bioresource Technol.* 2001. Vol. 77. P. 19–24. doi: 10.1016/S0960-8524(00)00142-5

Raouf B., Kaushik B. D., Prasanna R. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass and Bioenergy*. 2006. Vol. 30. P. 537–542. doi: 10.1016/j.biombioe.2005.09.006

Sili C., Torzillo G., Vonshak A. *Arthrospira* (*Spirulina*). Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time. Eds. B. Whitton. New York; London: Springer Dordrecht Heidelberg, 2012. P. 677–705. doi: 10.1007/978-94-007-3855-3_25

Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1999. Vol. 299. P. 152–178. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Singleton V. L., Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1965. Vol. 16. P. 144–153.

Vieira Salla A. C., Margarites A. C., Seibel F. I., Holz L. C., Brião V. B., Bertolin T. E., Colla L. M., Vieira Costa J. A. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. *Bioresource Technol.* 2016. Vol. 209. P. 133–141. doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.069

Vonshak A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology. London: CRC Press, 2002. 252 p.

Zöllner N., Kirsch K. Z. Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin*. 1962. Vol. 135, no. 6. P. 545–561.

Received September 10, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ:

Петрухина Дарья Игоревна

ассистент кафедры
Калужский государственный университет
имени К. Э. Циолковского
ул. Степана Разина, 26, Калуга, Россия
эл. почта: daria.petrukhina@outlook.com

CONTRIBUTOR:

Petrukhina, Daria

Tsiolkovsky Kaluga State University
26 Stepan Razin St., Kaluga, Russia
e-mail: daria.petrukhina@outlook.com

УДК 661.778:616.5–001.19

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ КОЛЛАГЕНА ДЕРМЫ КРЫС ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ХОЛОДОВОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

**Н. А. Шутский¹, Л. Л. Шагров¹, С. Л. Кашутин¹, А. С. Аксенов²,
С. И. Малявская¹**

¹ Северный государственный медицинский университет, Архангельск, Россия

² Северный (Арктический) федеральный университет имени М. В. Ломоносова,
Архангельск, Россия

Изучена динамика массы коллагена крыс в условиях локального холодового повреждения. Разработан и впервые применен метод количественного определения коллагена дермы. Холодовую травму воспроизводили на беспородных самцах и самках крыс массой 180–200 г путем наложения на депилированную кожу спины металлической гири диаметром 2,5 см, охлажденной в жидком азоте. На 3-и сут после холодового повреждения у крыс регистрировали статистически значимое снижение содержания коллагена. С 14-е сут после холодового повреждения наблюдали увеличение содержания коллагена за счет восстановленной активности фибробластов. К 21-м сут увеличение содержания коллагена продолжалось, но полного восстановления не наблюдалось.

К л ю ч е в ы е с л о в а: холодовое повреждение; дерма; коллаген; ферментативный гидролиз; восстановление.

**N. A. Shutskiy, L. L. Shagrov, S. L. Kashutin, A. S. Aksenov, S. I. Ma-
lyavskaya. CHANGES IN THE COLLAGEN CONTENT IN THE DERMIS OF
RATS AFTER LOCAL COLD INJURIES**

Changes in collagen mass in rats were studied under the conditions of local cold injuries. A method for quantitative determination of collagen in the dermis was developed and applied for the first time. Cold injury was replicated in mongrel male and female rats weighing 180–200 grams by applying a metal weight 2.5 cm in diameter, cooled in liquid nitrogen, to depilated skin on the back. A statistically significant decrease in collagen content was recorded in rats on day 3 after cold damage. Starting with the 14th day after the cold injury, an increase in collagen content was observed due to the restored activity of fibroblasts. By the 21st day, collagen content continued increasing, but full recovery was not observed.

Key words: cold injury; dermis; collagen; enzymatic hydrolysis; recovery.

Введение

Холодовая травма является одной из важнейших медико-социальных проблем как в во-

енное, так и в мирное время, при стихийных бедствиях, авариях, катастрофах [Pulla et al., 1994; Плотников, 2000; Галеев и др., 2002; Ingram, Raymond, 2013]. Тяжесть осложнений

и большой процент выхода на инвалидность трудоспособного контингента общества придают данной проблеме не только медико-социальную, но и экономическую направленность, что приобретает особое значение в условиях освоения Арктики [Pulla et al., 1994; Сизоненко, 1997; Будко и др., 2000; Сизоненко и др., 2002; Таранова, 2009; Ingram, Raymond, 2013].

Изучение процессов восстановления тканей после термических воздействий, как ожогов, так и обморожений, является одним из актуальных направлений регенеративной медицины. Особая роль в процессах регенерации соединительной ткани отводится компонентам межклеточного матрикса (МКМ). Коллаген, как один из основных компонентов МКМ, составляет около 90 % от сухого веса МКМ, обеспечивает структурную поддержку, участвует в регуляции различных процессов, протекающих в норме и при возникновении различных патологических состояний: регуляция межклеточных коммуникаций, адгезии, миграции, пролиферации, дифференцировки и др. В связи с чем актуальным представляется вопрос о выборе адекватной методики для оценки содержания данного компонента МКМ в процессе восстановления соединительной ткани при различных повреждениях [Байрейтер и др., 1995; Sorrel, Caplan, 2004; Омельяненко, Слуцкий, 2009; Бозо и др., 2010].

Основным продуцентом белков межклеточного матрикса являются дермальные фибробласты, формирующие трехмерную структурную сеть дермы [Ардашев и др., 2000; Banzo et al., 2002; Finderle, 2002; Гарстукова и др., 2008; Шаповалов, 2008; Карайланов и др., 2008]. Структура коллагенового матрикса оказывает значительное влияние на функции фибробластов [Fisher et al., 2008]. Согласно исследованию Ф. Гриннелл, физические свойства коллагеновых волокон непосредственно влияют на функциональную активность фибробластов дермы. В частности, фрагментация коллагенового матрикса приводит к дезорганизации целостности коллагеновой сети МКМ и к нарушению фокальных контактов между фибробластами и коллагеновым матриксом. Данные процессы лишают фибробласты возможности находиться в растянутом состоянии, являющемся обязательным условием для их метаболической активности (роста и функционирования) [Grinnell, 2003].

Вполне очевидно, что влияние на рост и развитие соединительной ткани и может быть одним из решений, способных повысить эффективность лечения локальных отморожений. С опорой на это предположение возникает

интерес к изучению механизмов, направленных на замещение дефектов собственными тканями.

Известно, что на 7-е сут после локального холодового повреждения в зоне поражения появляются небольшие очаговые скопления фибробластов [Ардашев и др., 2000; Banzo et al., 2002; Finderle, 2002; Гарстукова и др., 2008; Шаповалов, 2008; Карайланов и др., 2008]. Но данные, подтверждающие, что эти фибробласты функционально активны, отсутствуют.

В настоящее время известны несколько способов количественного определения содержания коллагена. Один из них заключается в проведении реакции антиген – антитело с использованием меченых радиоактивными изотопами реактивов [Земсков и др., 1982]. Недостатками указанного способа являются невозможность исследования образцов тканей (способ применим только для растворов) и необходимость применения радиоактивных веществ.

Также существует способ количественного определения коллагена в ткани [Виллануэва и др., 2006]. Положительными в данном способе являются возможность точного определения концентрации коллагена, широкий спектр применения. Недостатками – технологическая сложность процедуры, необходимость применения хроматографа высокого давления, высокая стоимость применяемого оборудования и расходных материалов, реактивов.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение динамики содержания коллагена дермы крыс в восстановительном периоде после локального холодового повреждения, тем самым планировалось косвенно определить синтетическую активность продуцентов коллагена.

Материалы и методы

Эксперимент проводили в соответствии с Правилами лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»), а также с учетом требований «Международной Хельсинкской конвенции о гуманном отношении к животным» (1972).

Холодовую травму воспроизводили на беспородных самцах и самках крыс массой 180–200 г, содержащихся в одинаковых условиях, на стандартном пищевом режиме. После наступления наркотического сна моделировали контактное отморожение с помощью металлической гирьки диаметром 2,5 см, которую предварительно охлаждали в жидком азо-

те, а потом прикладывали к депилированной коже спины крысы на 3 мин по методу [Бойко, 2010]. В результате такого воздействия у экспериментальных животных развивалось локальное отморожение 3-й степени [Тодоров, 1968].

Кусочек пораженной кожи забирали посредством панч-скальпеля № 5 сразу после передозировки средства для наркоза на 3, 7, 14 и 21-е сут. В качестве контрольной группы были использованы беспородные крысы аналогичной массы тела, содержащиеся в тех же условиях, что и опытная группа. Группы формировали из 7 животных.

Определение содержания коллагена в дерме осуществляли следующим методом:

1 этап – высушивание кожи. Предварительно взвешенный и замороженный при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в 1 мл 0,9% физиологического раствора хлорида натрия кусочек ткани высушивали в лиофильной сушилке при температуре $-46\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давлении 0,040 мБар, измельчали путем нарезания микротомным лезвием на фрагменты толщиной не более 3 мм;

2 этап – подготовка к ферментативному гидролизу. Полученные фрагменты поместили в градуированную пробирку Eppendorf вместимостью 1,5 мл, заливали 1 мл 15% водного раствора гидроксида натрия на 24 часа при температуре $18\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$, после чего неоднократно промывали дистиллированной водой при температуре $18\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в объеме 1 мл. После достижения целевого уровня pH надосадочной жидкости 7,0 супернатант аспирировали дозатором таким образом, чтобы количество осадка в пробирке не превышало 0,3 мл. Полученный материал замораживали при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, высушивали в лиофильной сушилке и взвешивали на аналитических весах, определяя массу материала m_1 ;

3 этап – ферментативный гидролиз коллагена. Полученный безводный осадок разводили в 900 мкл фосфатного буферного раствора с pH 7,0 и добавляли 100 мкл раствора коллагеназы (Россия), который заранее приготавливали путем растворения лиофильно высушенного препарата коллагеназы в 10 мл фосфатного буферного раствора с уровнем pH 7,0. Затем пробирку с содержимым устанавливали в шейкер-инкубатор ES-20 (BioSan, Латвия) при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и интенсивно перемешивали в течение 2 часов. После этого пробирку центрифугировали при 13400 об/мин в течение 5 минут, аспирировали дозатором надосадочную жидкость, добавляли дистиллированную воду до объема 1 мл, гомогенизировали полученный материал. Процедуру, включающую гомогени-

зацию путем ресуспендирования дозатором, центрифугирование, аспирацию надосадочной жидкости и добавление воды до объема 1 мл, повторяли 5 раз. После этого материал замораживали при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, лиофильно высушивали и взвешивали, определяя массу материала m_2 . По разнице масс m_1 и m_2 находили массу коллагена, содержащегося в исследуемой ткани. Процентное содержание коллагена в ткани определяют отношением установленной массы коллагена к массе образца ткани.

Таким образом, содержание коллагена определяли по формуле:

$$m_{\text{коллагена}} = m_1 - m_2, \text{ г},$$

где m_1 – масса кожи до ферментативного гидролиза, г; m_2 – масса кожи после ферментативного гидролиза, г.

Процентное содержание коллагена в ткани определяли по формуле:

$$\begin{aligned} \% \text{ содержания коллагена} &= \\ &= \frac{\text{масса коллагена}}{\text{масса образца ткани}} * 100 \%. \end{aligned}$$

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью SPSS 13.0 for Windows. Описание выборок проводили с помощью подсчета медианы (Md) и межквартильного интервала Q25Q75. Вероятность различий оценивали по непараметрическому критерию Колмогорова – Смирнова.

Результаты и обсуждение

Как следует из представленных в таблице данных, на 3-и сут после локального холодового повреждения у крыс регистрировали статистически значимое снижение массы коллагена дермы и его процентного содержания до 21,71 %, что связано с наличием воспалительных процессов, разрушением кровеносных сосудов и замедлением процесса неоколлагенеза. Но уже на 7-е сут после холодового повреждения масса коллагена начала восстанавливаться, достигнув 5,25 мг. Наряду с увеличением массы коллагена существенно увеличилось его процентное содержание в дерме. В период с 7-х по 14-е сут увеличение массы коллагена и его процентного содержания в собственно коже регистрировали только в виде тенденции: до 6,0 мг и до 35,91 % соответственно. Статистически значимое увеличение количества коллагена вновь возобновилось с 14-х по 21-е сут, достигнув уровня 8,95 мг, что также отразилось на увеличении его процентного содержания. Масса коллагена дермы, как

Масса коллагена (мг) и его % содержание в дерме крыс после локального холодового повреждения Md (Q25; Q75)

The mass of collagen (mg) and its percentage content in the dermis of rats after local cold injuries Md (Q25; Q75)

Показатели Indicators	Контроль Control n=7	Сроки исследования Terms of research				Вероятность Probability
		3 n=7	7 n=7	14 n=7	21 n=7	Уровень значимости различий (p) Significance level of differences (p)
1	2	3	4	5	6	7
Масса коллагена (мг) Mass of collagen (mg)	10,7 (9,0;12,3)	3,1 (2,8; 3,9)	5,25 (4,97; 5,92)	6,0 (5,7; 7,0)	8,95 (8,62; 9,57)	2-3 Z = 1,87; p = 0,002 2-4 Z = 1,79; p = 0,003 2-5 Z = 1,6; p = 0,01 2-6 Z = 1,13; p = 0,15 3-4 Z = 1,79; p = 0,003 3-5 Z = 1,87; p = 0,002 3-6 Z = 1,93; p = 0,001 4-5 Z = 0,94; p = 0,33 4-6 Z = 1,85; p = 0,002 5-6 Z = 1,65; p = 0,008
Содержание коллагена в дерме (%) Collagen content in the dermis (%)	71,43 (59,21; 72,78)	21,71 (16,37; 22,51)	31,15 (30,02; 33,55)	35,91 (32,39; 49,29)	52,27 (46,42; 55,17)	2-3 Z = 1,87; p = 0,02 2-4 Z = 1,79; p = 0,003 2-5 Z = 1,87; p = 0,02 2-6 Z = 1,69; p = 0,007 3-4 Z = 1,79; p = 0,003 3-5 Z = 1,87; p = 0,002 3-6 Z = 1,93; p = 0,001 4-5 Z = 1,24; p = 0,09 4-6 Z = 1,85; p = 0,002 5-6 Z = 1,38; p = 0,04

и его содержание в дерме, на 21-е сутки практически была такой же, как и в группе контроля.

Таким образом, после локального холодового повреждения увеличение массы коллагена дермы и его процентного содержания происходит с 3-х по 7-е и с 14-х по 21-е сут.

Известно, что на 3-и сут при 3-й степени отморожения эпидермис полностью слущен, сосочковый слой дермы разрушен, а в сетчатой дерме – выраженный фибриноидный некроз [Гарстукова и др., 2008; Карайланов и др., 2008; Шаповалов, 2008]. Вполне очевидно, что содержание массы коллагена к 3-м сут минимальное: он разрушен и синтез новых волокон не наблюдается.

На основании увеличения массы коллагена и его процентного содержания в дерме с 3-х по 7-е сут можно полагать о начале репаративных процессов именно в этот период. Таким образом, скопления фибробластов в очаге локального холодового повреждения на 7-е сут являются функционально активными в направлении синтеза волокнистых структур соединительной ткани.

С 7-х по 14-е сут регистрируется увеличение массы коллагена и его процент содержания, но оно не является статистически значимым. Следующий пик наблюдается с 14-х по 21-е сут. Учитывая, что статистически значимых

различий в массе коллагена и его процентного содержания между группой контроля и опытной группой на 21-е сут не отмечено, можно считать, что изучаемые параметры одинаковы, и это позволяет полагать о частичном восстановлении массы коллагена дермы к 21-м суткам.

Заключение

В настоящей работе впервые применяется способ определения количества коллагена в ткани. Преимуществами предложенного метода являются: уменьшение материальных и временных затрат и такое важное преимущество, как избегание использования радиоактивных веществ.

Проведенное исследование количественного анализа коллагена, формируемого в ходе восстановления после локального холодового повреждения, позволяет судить о проявлении активности фибробластов к синтезу основного белка межклеточного матрикса. Благодаря предложенному способу определения количества коллагена можно отслеживать формирование данного белка в дерме в динамике заживления раневой поверхности.

Полученные данные свидетельствуют о том, что содержание коллагена дермы после холо-

догового повреждения резко снижается с 10,6 до 3,9 мг и в процессе заживления раневой поверхности увеличивается, не достигая исходных данных к 21-м суткам.

Литература

Ардашев И. П., Плотников Г. А., Григорук А. А. и др. Остеомиелит позвоночника // Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. 2000. № 3. С. 70–75.

Байрейтер К., Франц П., Родеман Х. Фибробласты при нормальной и патологической терминальной дифференцировке, старении, апоптозе и трансформации // Онтогенез. 1995. № 236(1). С. 22–37.

Бозо И. Я., Деев Р. В., Пинаев Г. П. Фибробласт – специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения? // Цитология. 2010. № 52(2). С. 99–109.

Бойко В. В. Изучение морфологических особенностей в тканях экспериментальных животных при моделировании холодовой травмы // Вестник морфологии. 2010. № 16(3). С. 526–528.

Будко А. А., Кичемасов С. Х., Скворцов Ю. Р., Барановский А. М., Ретунских В. П., Хороший К. А. Особенности оказания медицинской помощи при отморожениях в советско-финской войне // Военно-медицинский журнал. 2000. № 4(1). С. 73–78.

Галеев А. Р., Игишева Л. Н., Казин Э. М. Вариабельность сердечного ритма у здоровых детей в возрасте 6–16 лет // Физиология человека. 2002. № 28(4). С. 61–65.

Гарстукова Л. Г., Кузнецов С. Л., Деревянко В. Г. Наглядная гистология (общая и частная) М.: МИА, 2008. 204 с.

Карайланов М. Г. Термоизоляция пораженных тканей как профилактика некрозов при холодовых поражениях в вооруженных конфликтах // Вестн. Рос. воен.-мед. акад. 2008. № 1. С. 70–73.

Омельяненко Н. П., Слуцкий Л. И. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). М.: Известия, 2009. 378 с.

Плотников Г. А. Диагностика поражения тканей в раннем периоде отморожений // Новые направления в клинической медицине: материалы Всерос. конф. Ленинск-Кузнецкий, 2000. С. 162–163.

Патент РФ № 2452956. 2012. Виллануэва П. А., Макналти Э. К., Беникер Г. Д., Киесветтер К. Способ

количественного определения коллагена в ткани // Заявка № 2009109113/15. 21.09.2006.

Патент СССР № 935792. 15.06.1982. Земсков В. М., Смирнов М. Д., Алексеев А. Б., Масенко В. П. Способ количественного определения коллагена // Описание изобретения к авторскому свидетельству № 935792, 1980. Бюл. № 22. Заявка № 2966207/30-15.

Сизоненко В. А. Классификация холодовой травмы: Тезисы докл. VI съезда травматологов и ортопедов России. Н. Новгород, 1997. 138 с.

Сизоненко В. А., Кузник Б. И., Витковский Ю. А., Подойницына В. И. Биорегулирующая терапия у больных с острой холодовой травмой: Третья научная конференция по проблеме «Холодовая травма»: Сб. тезисов. СПб., 2002. С. 68–70.

Таранова Е. В. Пути повышения эффективности лечения отморожений (экспериментально-клиническое исследование): дис. ... канд. мед. наук. Курск, 2009. 79 с.

Тодоров Й. Т. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. София: 6-е рус. изд-во, 1968. 784 с.

Шаповалов К. Г. Изменения компонентов сосудистого тонуса и показателей микроциркуляции при отморожениях нижних конечностей // Вестник хирургии имени И. И. Грекова. 2008. № 3. С. 67–68.

Banzo J., Martínez V. G., Abós M. D. Frostbite of the upper and lower limbs in an expert mountain climber: the value of bone scan in the prediction of amputation level // Rev. Esp. Med. Nucl. 2002. No. 21(5). P. 366–369.

Ingram B. J., Raymond T. J. Recognition and treatment of freezing and nonfreezing cold injuries // Curr. Sports. Med. Rep. 2013. No 12(2). P. 125–130. doi: 10.1249/JSR.0b013e3182877454

Finderle Z. Delayed treatment of frostbite injury with hyperbaric oxygen therapy: a case report // Aviat Space Environ Med. 2002. Vol. 73, no. 4. P. 392–394.

Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices // Trends Cell Biol. 2003. No. 13(5). P. 264–269.

Pulla R. J., Pickard L. J., Carnett T. S. Frostbite: an overview with case presentations // J. Foot Ankle Surg. 1994. No. 33(1). P. 53–63.

Sorrel J. M., Caplan A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep // J. Cell Sci. 2004. No. 117. P. 667–675.

Поступила в редакцию 16.01.2019

References

Ardashev I. P., Plotnikov G. A., Grigoruk A. A. et al. Osteomyelitis of the vertebrae [Vertebral osteomyelitis]. *Vestnik travmatologii i ortopedii im. N. N. Priorova* [N. N. Priorov J. of Traumatology and Orthopedics]. 2000. No. 3. P. 70–75.

Baireiter K., Frants P., Rodeman Kh. Fibroblasts in normal and pathological terminal differentiation, aging, apoptosis and transformation. *Ontogenez* [Ontogenesis]. 1995. No. 236(1). P. 22–37.

Bozo I. Ya., Deev R. V., Pinaev G. P. Fibroblast – spetsializirovannaya kletka ili funktsional'noe sostoyanie kletok mezenkhimnogo proiskhozhdeniya? [Is a fibroblast a specialized cell or a functional state of cells of mesenchymal origin?]. *Tsitologiya* [Cytology]. 2010. No. 52(2). P. 99–109.

Boiko V. V. Izuchenie morfologicheskikh osobnostei v tkanyakh eksperimental'nykh zhivotnykh pri modelirovanii kholodovoi travmy [The study of morphological features in the tissues of experimental animals in the simulation of cold injury]. *Vestnik mor-*

fologii [Reports of Morphology]. 2010. No. 16(3). P. 526–528.

Budko A. A., Kichemasov S. Kh., Skvortsov Yu. R., Baranovskii A. M., Retunskikh V. P., Khoroshii K. A. Osobennosti okazaniya meditsinskoi pomoshchi pri otmorozheniyakh v sovetsko-finskoj voine [Features of medical care for frostbite in the Soviet-Finnish war]. *Voenno-meditsinskii zhurn.* [Military Medicine J.]. 2000. No. 4(1). P. 73–78.

Galeev A. R., Igisheva L. N., Kazin E. M. Variabel'nost' serdechnogo ritma u zdorovykh detei v vozraste 6–16 let [Heart rate variability in healthy children aged 6–16 years]. *Fiziol. cheloveka* [Human Physiol.]. 2002. No. 28(4). P. 61–65.

Garstukova L. G., Kuznetsov S. L., Derevyanko V. G. Naglyadnaya gistologiya (obshchaya i chastnaya) [Visual histology (general and special)]. Moscow: MIA [Medical Information Agency], 2008. 204 p.

Karaylanov M. G. Termoizolyatsiya porazhennykh tkanei kak profilaktika nekrozov pri kholodovykh porazheniyakh v vooruzhennykh konfliktakh [Thermal insulation of affected tissues as prevention of necrosis during cold lesions in armed conflicts]. *Vestn. Ros. voen.-med. akad.* [Bull. Naval Acad.]. 2008. No. 1. P. 70–73.

Omel'yanenko N. P., Slutskii L. I. Soedinitel'naya tkan' (gistofiziologiya i biokhimiya) [Connective tissue (histophysiology and biochemistry)]. Moscow: Izvestia, 2009. 378 p.

Plotnikov G. A. Diagnostika porazheniya tkanei v rannem periode otmorozhenii [Diagnosis of tissue damage in the early period of frostbite]. *Novye napravleniya v klinicheskoi meditsine: mat. Vseros. konf. Leninsk-Kuznetskii* [New directions in clinical medicine: Proceed. All-Russ. conf., Leninsk-Kuznetsky]. 2000. P. 162–163.

Patent RF № 2452956. 2012 [Patent of the Russian Federation No. 2452956. 2012]. *Villanueva P. A., Maknalti E. K., Beniker G. D., Kiesvetter K.* Sposob kolichestvennogo opredeleniya kollagena v tkani [A method for collagen quantification in tissues]. Zayavka № 2009109113/15. 21.09.2006 [Application No. 2009109113/15. 21.09.2006].

Patent SSSR № 935792 [Patent of the USSR No. 935792]. 15.06.1982. *Zemskov V. M., Smirnov M. D., Alekseev A. B., Masenko V. P.* Sposob kolichestvennogo opredeleniya kollagena [A method for collagen quantification]. Opisaniye izobreteniya k avtorskomu svidetel'stvu № 935792, 1980. Byul. № 22. Zayavka № 2966207/30–15 [Description of the invention for the inventor's certificate No. 935792, 1980. Bull. 22. Application No. 2966207/30–15].

Shapovalov K. G. Izmeneniya komponentov sosudistogo tonusa i pokazatelei mikrotsirkulyatsii pri otmorozheniyakh nizhnikh konechnostei [Changes in the components of vascular tone and microcirculation indices in frostbite of the lower extremities]. *Vestnik khirurgii imeni I. I. Grekova* [Grekov's Bull. of Surgery]. 2008. No. 3. P. 67–68.

Sizonenko V. A. Klassifikatsiya kholodovoi travmy [Classification of cold injury]. *Tez. dokl. VI s'ezda travmatologov i ortopedov Rossii* [Abs. VI Congress of traumatologists and orthopedists of Russia]. N. Novgorod, 1997. 138 p.

Sizonenko V. A., Kuznik B. I., Vitkovskii Yu. A., Podoinitsyna V. I. Bioreguliruyushchaya terapiya u bol'nykh s ostroi kholodovoi travmoi [Bioregulating therapy in patients with acute cold trauma]: Tret'ya nauch. konf. po probleme "Kholodovaya travma": Sb. tezisov [Problem of "cold injury": Proceed. of the 3rd sci. conf.]. St. Petersburg, 2002. P. 68–70.

Taranova E. V. Puti povysheniya effektivnosti lecheniya otmorozhenii (eksperimental'no-klinicheskoe issledovanie) [Ways to improve the effectiveness of frostbite treatment (experimental clinical study)]. Kursk, 2009. 79 p.

Todorov Y. T. Klinicheskie laboratornye issledovaniya v pediatrii [Clinical laboratory studies in pediatrics]. Sofia: 6th Rus. ed., 1968. 784 p.

Banzo J., Martínez V. G., Abós M. D. Frostbite of the upper and lower limbs in an expert mountain climber: the value of bone scan in the prediction of amputation level. *Rev. Esp. Med. Nucl.* 2002. No. 21(5). P. 366–369.

Ingram B. J., Raymond T. J. Recognition and treatment of freezing and nonfreezing cold injuries. *Curr. Sports. Med. Rep.* 2013. No. 12(2). P. 125–130. doi: 10.1249/JSR.0b013e3182877454

Finderle Z. Delayed treatment of frostbite injury with hyperbaric oxygen therapy: a case report. *Aviat Space Environ Med.* 2002. Vol. 73, no. 4. P. 392–394.

Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol.* 2003. No. 13(5). P. 264–269.

Pulla R. J., Pickard L. J., Carnett T. S. Frostbite: an overview with case presentations. *J. Foot. Ankle. Surg.* 1994. No. 33(1). P. 53–63.

Sorrel J. M., Caplan A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J. Cell Sci.* 2004. No. 117. P. 667–675.

Received January 16, 2019

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шутский Никита Алексеевич

лаборант-исследователь
Северный государственный медицинский университет
пр. Троицкий, 51, Архангельск, Россия, 163000
эл. почта: nikitashutskij@rambler.ru
тел.: +79009204623

CONTRIBUTORS:

Shutskiy, Nikita

Northern State Medical University
51 Troitskiy Ave., 163000 Arkhangelsk, Russia
e-mail: nikitashutskij@rambler.ru
tel.: +79009204623

Шагров Леонид Леонидович

младший научный сотрудник
Северный государственный медицинский университет
пр. Троицкий, 51, Архангельск, Россия, 163000
эл. почта: leonidshagrov@mail.ru
тел.: +79506608685

Кашутин Сергей Леонидович

заведующий каф. кожных и венерических болезней, д. м. н.
Северный государственный медицинский университет
пр. Троицкий, 51, Архангельск, Россия, 163000
эл. почта: sergeycash@yandex.ru
тел.: +79062812390

Аксенов Андрей Сергеевич

заведующий каф. биологии, экологии и биотехнологии,
к. т. н.
Северный (Арктический) федеральный университет
им. М. В. Ломоносова
наб. Северной Двины, 17, Архангельск, Россия, 163002
эл. почта: a.s.aksenov@narfu.ru
тел.: +79212915446

Малявская Светлана Ивановна

проректор по научно-инновационной работе,
д. м. н., проф.
Северный государственный медицинский университет
пр. Троицкий, 51, Архангельск, Россия, 163000
эл. почта: malyavskaya@yandex.ru
тел.: +79214809546

Shagrov, Leonid

Northern State Medical University
51 Troitskiy Ave., 163000 Arkhangelsk, Russia
e-mail: leonidshagrov@mail.ru
tel.: +79506608685

Kashutin, Sergey

Northern State Medical University
51 Troitskiy Ave., 163000 Arkhangelsk, Russia
e-mail: sergeycash@yandex.ru
tel.: +79062812390

Aksenov, Andrey

Northern (Arctic) Federal University named after
M. V. Lomonosov
17 Severnaya Dvina Emb., 163002 Arkhangelsk, Russia
e-mail: a.s.aksenov@narfu.ru
tel.: +79212915446

Malyavskaya, Svetlana

Northern State Medical University
51 Troitskiy Ave., 163000 Arkhangelsk, Russia
e-mail: malyavskaya@yandex.ru
tel.: +79214809546

УДК 556.114:551.583:556.072 (268.46)

ИЗМЕНЧИВОСТЬ БИОГЕОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В БЕЛОМ МОРЕ ДЛЯ РАЗНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ПО ДАННЫМ МОДЕЛИРОВАНИЯ

А. В. Толстиков¹, И. А. Чернов²

¹ Институт водных проблем Севера КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН»,
Петрозаводск, Россия

² Институт прикладных математических исследований КарНЦ РАН,
ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

Изменчивость биогеохимических процессов Белого моря при разных климатических условиях исследовалась посредством численных экспериментов. Отобранные модельные годы условно разделены на теплые, холодные и средние (климатические) согласно методике, предложенной авторами ранее. Для численного моделирования применен программный комплекс JASMINE, основанный на модели термогидродинамики Северного Ледовитого океана FEMAO и содержащий модель пелагической экосистемы BFM. Комплекс предназначен для совместного моделирования термогидродинамических и биогеохимических процессов в море. Подробно рассмотрены модельные годы: теплый 2013-й и холодный 1994-й. Изучена динамика температуры поверхностного слоя и толщи воды Белого моря в эти годы, распределение хлорофилла *a* и первичной продукции. Получены закономерности и проанализированы причины наблюдающихся зависимостей в условно теплый и условно холодный год. На проявление в биогеохимических процессах Белого моря теплых, холодных и средних лет влияют макроциркуляционные процессы атмосферы, одним из которых является Северо-Атлантическое колебание, или NAO (North Atlantic Oscillation). События NAO (положительные и отрицательные) соответствуют положительным и отрицательным периодам в температуре поверхностного слоя Белого моря. NAO характеризуется разностью давления между Исландским минимумом и Азорским максимумом, а это в свою очередь сказывается на усилении или ослаблении западного переноса в Северном полушарии, перераспределении тепла и влаги. В результате численных экспериментов выделен ключевой период года, приходящийся на май. В этот месяц отмечается интенсификация процессов в пелагической экосистеме Белого моря независимо от его принадлежности к теплому или холодному году. Выявлена связь событий мая с дальнейшим развитием биогеохимических процессов в течение лета.

Ключевые слова: Белое море; пелагическая экосистема; биогеохимия; моделирование; JASMINE; BFM.

A. V. Tolstikov, I. A. Chernov. VARIABILITY OF BIOGEOCHEMICAL PROCESSES IN THE WHITE SEA UNDER DIFFERENT CLIMATIC CONDITIONS: THE MODELING APPROACH

The JASMINE numerical complex based on the FEMAO model of the Arctic Ocean and the BFM pelagic ecosystem model is used for integrated modeling of hydrody-

namic, thermodynamic, and biogeochemical processes in the White Sea. The variation of the White Sea ecosystems under different climatic conditions, i. e., a warm, cold, and an average (close to multiannual average) year, is studied by numerical experiments. Several years are considered in detail: the warm 2013 and the cold 1994, including the surface layer and the water column temperature, the distribution of chlorophyll *a*, primary production. We reveal some regularities and explain the observed dependencies in the warm and the cold year. The phenomenon of warm, cold, and average years in the biogeochemical processes in the White Sea is influenced by global oscillations in the atmosphere, mainly the North Atlantic Oscillation (NAO). The events of the North Atlantic oscillation (both positive and negative) correspond to positive and negative deviations of the surface layer temperature of the White Sea. NAO is generated by the pressure difference between the Icelandic minimum and the Azores maximum, which, in turn, amplifies the Western transport in the Northern hemisphere, redistribution of heat and moisture. According to the numerical experiments, the key period of the year for the pelagic ecosystem dynamics is May. It is shown to be tightly connected to the later biogeochemical processes during the summer.

Keywords: White Sea; pelagic ecosystem; biogeochemistry; modeling; JASMINE; BFM.

Введение

Исследование экосистем Белого моря с помощью сложных комплексных математических моделей диктуется необходимостью согласованного описания термогидродинамических и биогеохимических процессов этого водоема. Актуально знать ключевые события года и закономерности гидрологических характеристик Белого моря под воздействием климатических изменений и реакцию его экосистем на потепление и похолодание, изменчивость ледового режима, антропогенное воздействие.

Моделирование позволяет ставить эксперименты, которые затруднительно или невозможно провести в природных условиях. Так, можно изучить реакцию процессов в Белом море без прилива или в полностью безветренный год, что важно для определения вклада каждого фактора. Аналогично есть возможность изменить облачность, объем речного стока, температуру воздуха и воды, прозрачность льда, поток солнечной радиации для рассмотрения сценарных ситуаций. Помимо естественных факторов можно оценить антропогенное воздействие, например динамику переноса загрязнителей различного генезиса (нефтяные пятна, пластик и т. п.).

Морские пелагические сообщества живых организмов относительно быстро реагируют на внешние воздействия. Эти организмы имеют короткий жизненный цикл по сравнению, например, с донными сообществами, поэтому отклик пелагической экосистемы на внешний фактор, как правило, быстрее и ярче выражен. Ключевым событием в сезонном цикле изменений пелагических сообществ Белого моря

является наступление весны: сход льда, резкое увеличение поступления солнечной радиации, половодье на реках водосбора, поступление биогенных элементов и т. д. Зная отклик экосистем на воздействующие факторы, можно рассчитать сценарий дальнейшего развития процесса.

Для понимания механизма термогидродинамических и биогеохимических закономерностей в морской системе и взаимного влияния факторов незаменимы комплексные трехмерные численные модели, адекватно отражающие динамику процессов. В сочетании с прямыми и дистанционными измерениями различных параметров в водоеме результаты моделирования вносят заметный вклад в интерпретацию взаимосвязи событий и сценариев их развития.

Для Белого моря в настоящий момент, насколько нам известно, функционирует только один такой программный комплекс – JASMINE [Chernov et al., 2018], включающий в себя модель экосистемы моря BFM [<http://bfm-community.eu>].

Материалы и методы

Численное воспроизведение динамики состояния моря как комплексной системы вод, льда и экосистем требует использования достаточно производительных вычислительных средств, современных алгоритмов и адекватного математического описания. Обзор существующих моделей динамики Белого моря, включая экосистемы, был достаточно полно освещен в предыдущих работах [Белое..., 2007; Толстикова, 2016]. Мы развиваем, применительно к Белому морю, программный ком-

плекс JASMINE [Чернов и др., 2016; Толстикова и др., 2017; Chernov et al., 2018]. Он создан на базе модели Северного Ледовитого океана (FEMAO) Н. Г. Яковлева [2009] и в соавторстве с ним. Программный комплекс позволяет рассчитывать динамику течений и термохалинных полей, характеристики морского льда (количество и сплоченность льда разной толщины, а также количество снега на нем), уровень моря. Возможно воспроизведение переноса примесей произвольной природы. В качестве экосистемного блока для Белого моря выбрана модель BFM (<http://bfm-community.eu>), пригодная для водоемов разных масштабов (от региональных морей до Мирового океана), разных климатических условий [Vichi et al., 2015a; Lazzagari et al., 2016] и внедренная, например, в программный комплекс NEMO [Vichi et al., 2015b]. Модель BFM описывает потоки вещества между различными группами (автотрофных и гетеротрофных организмов, бактерий, фракций взвешенного органического вещества, растворенного неорганического вещества) в силу многочисленных биохимических процессов (питание, фотосинтез, разложение вещества и т. п.). Учитывается гравитационное осаждение ряда компонент экосистемы (в частности, детрита) и обмен вещества с донными отложениями, играющими важную роль в относительно мелководном Белом море.

Результаты и обсуждение

Рассмотрен период с 1975 по 2014 г., по продолжительности превышающий климатическую норму 1981–2010 гг. [Коршунова, Швець, 2014]. В нем выбирались характерные модельные годы на базе нашей методики [Толстикова, 2016, §2.2], основанной на анализе среднегодовых значений температуры воды. Годы делятся на теплые, холодные и средние (климатические) по температуре T , осредненной по объему моря либо по поверхностному слою. Ряд наблюдений составляет три неравные части в зависимости от средних и экстремальных значений. Граница температур для холодных лет зависит от разности между средней и минимумом, аналогично для теплых лет: между средней и максимумом. Каждый год периода с 1975 по 2014 г. классифицирован как теплый, холодный или средний на основе рассчитанной в модели средней по объему температуры воды Белого моря (табл.). Значения ниже 1,52 °C (1,10–1,52) относят год к холодным, выше 2,32 °C (2,32–2,68) – к теплым, а между 1,53 и 2,31 °C – к средним (климатическим). Аналогична классификация по модель-

ной средней температуре поверхностного слоя воды: ниже 3,11 °C (2,74–3,11) – холодный год, выше 3,96 °C (3,96–4,42) – теплый, между 3,12 и 3,95 °C – средний. Помимо температуры получены другие среднемесячные термогидродинамические и биогеохимические поля для характерных лет, с добавлением одного предыдущего и одного последующего года.

В качестве теплого взят 2013 г., так как среднегодовая модельная температура толщи воды и поверхностного слоя Белого моря за этот год составила соответственно 2,68 и 4,42 °C. Модельные среднемесячные значения получены для периода 2012–2014 гг. Холодный год – 1994 (1,10 °C – температура толщи; 3,03 °C – поверхности), период моделирования – 1993–1995 гг. Средний год – 2003 (1,73 °C – температура толщи; 2,95 °C – поверхности), период моделирования – 2002–2004 гг.

Средних лет значительно больше, поэтому особый интерес представляют именно отклонения, то есть теплые и холодные годы.

В таблице представлены только теплые и холодные годы за период 1975–2014 гг. Не все теплые или холодные годы по температуре поверхностного слоя совпадают с такими же по температуре толщи воды. Это связано с перераспределением тепла в течение года в море, что не происходит мгновенно; также играют роль допущения представленной методики [Толстикова, 2016]. Отметим, что по результатам моделирования в 2010–2014 гг. и по толще, и по поверхности моря объективно все годы теплые, а значения температуры воды во всем ряду 1975–2014 гг. максимальные. Таким образом, по модельным данным наблюдается потепление в районе Белого моря.

Модельные теплые, холодные и средние годы хорошо согласуются с результатами измерений, содержащимися в базе данных ИВПС КарНЦ РАН [Толстикова и др., 2010], собранной по результатам многолетних экспедиций. Так, измерения температуры в Онежском, Кандакшском и Двинском заливе, а также Бассейне за период 2001–2018 гг., выполненные в основном в теплое время года, и качественно, и количественно отражают тенденции изменчивости, отмеченные при анализе модельных данных. Это относится к положению фронтальных зон, прогреву заливов в теплые годы, более позднему цветению фитопланктона в холодные годы. Важной особенностью является то, что за последнее десятилетие отмечается увеличение температуры поверхностного слоя в заливах Белого моря. Это косвенно свидетельствует о наблюдающемся потеплении климата в районе Белого моря и по данным измерений.

Характерные годы по модельной температуре поверхностного слоя и водной толщи Белого моря (Т °С) для периода 1975–2014 гг.

Typical years of the model temperature of the surface layer and the water column of the White Sea (Т °С) for 1975–2014

Поверхностный слой Surface layer				Толща воды Water column			
Теплые Warm		Холодные Cold		Теплые Warm		Холодные Cold	
Год Year	Т	Год Year	Т	Год Year	Т	Год Year	Т
1989	4,34	1976	3,04	1975	2,33	1976	1,30
2000	4,17	1978	2,74	2000	2,48	1978	1,49
2005	4,09	1985	2,95	2009	2,55	1987	1,47
2011	4,40	1993	2,91	2010	2,63	1993	1,32
2012	4,00	1994	3,03	2011	2,63	1994	1,10
2013	4,42	1999	2,42	2012	2,49	1997	1,37
2014	4,00	2002	2,65	2013	2,68		
		2003	2,95	2014	2,61		

В мае интенсифицируются процессы в экосистемах Белого моря. После схода льда и увеличения продолжительности светового дня отмечается начало вегетации фитопланктона [Бергер, 2007].

Рассмотрим модельный холодный 1994 г. начиная с мая. В мае 1994 г. температура поверхностного слоя низкая, колеблется в районе 0 °С, лишь в вершинах Двинского и Онежского залива начинается потепление, связанное со сходом льда и начавшимся прогревом за счет воздействия солнечной радиации. В июне температура на большей части моря около 3–4 °С, в устьях рек Онега и Северная Двина идет активный прогрев. Температура июля не соответствует средним многолетним значениям для центральной части моря (11–12 °С), она существенно ниже (6 °С), лишь в Онежском заливе 13 °С. В августе происходит нагрев до среднемноголетних значений лишь в Онежском заливе, в Бассейне – 9 °С. В то же время на большей части водоема температура около 10 °С. В холодный год температура поверхностного слоя относительно высокая в осенние месяцы, лишь более быстро остывают заливы. Так, сентябрь и октябрь слабо различаются по этому показателю. В ноябре на большей части Белого моря температура поверхностного слоя около 4 °С, в заливах начинается замерзание. В декабре на большей части моря температура чуть ниже 0 °С.

Рассмотрим модельный теплый 2013 г. Уже в мае температура поверхностного слоя для акватории, прилегающей к Поморскому берегу, составляет 5–7 °С и практически для всей акватории Белого моря значения температуры положительные, за исключением Горла, Воронки и северной части Кандалакшского залива. В июне прогрев уже явно проявляется

на всей акватории, до 12 °С в Онежском заливе и 6 °С в Бассейне. В июле температура центральной части достигает 13 °С, а в Онежском заливе – 17 °С. В августе прогрев охватывает весь Бассейн (13–14 °С). В сентябре 2013 г. температура поверхностного слоя значительно выше (10–12 °С) по сравнению с тем же месяцем 1994 г. (около 9 °С). В октябре 2013 г. температура еще достаточно высокая, для большей части акватории выше 5 °С, но в устьях рек отмечается понижение до 2 °С. В ноябре также запас тепла значителен, температура в Бассейне выше 2 °С, в Онежском заливе температура отрицательная. В декабре в Бассейне присутствует пятно воды с положительными значениями температуры, но на большей части акватории температура ниже 0 °С.

В августе 2013 г. в Белом море была проведена комплексная экспедиция ИО РАН и ИВПС КарНЦ РАН. Измерения показали, что для данного времени года характерно классическое летнее распределение температуры Белого моря. Количественные показатели были выше, чем в 2012 г. Это касается и поверхностного, и придонного горизонтов [Политова и др., 2014]. Модельные данные за август 2013 г. согласуются с данными измерений.

Для модельного среднего 2003 г. характерны следующие особенности. В мае в северной части Белого моря температура колеблется в районе 0 °С, в южной части – 2–4 °С. В июне Онежский залив прогревается до 11 °С, севернее Соловецких островов на большей части акватории – около 5 °С, вдоль Карельского берега – 8–9 °С. В июле наблюдается очень мозаичная картина: Онежский залив – от 18 °С в устье до 13 °С южнее Соловецких о-вов, Кандалакшский залив – 13–15 °С, Двинский залив – 10 °С, Бассейн – от 5 до 10 °С. В Гор-

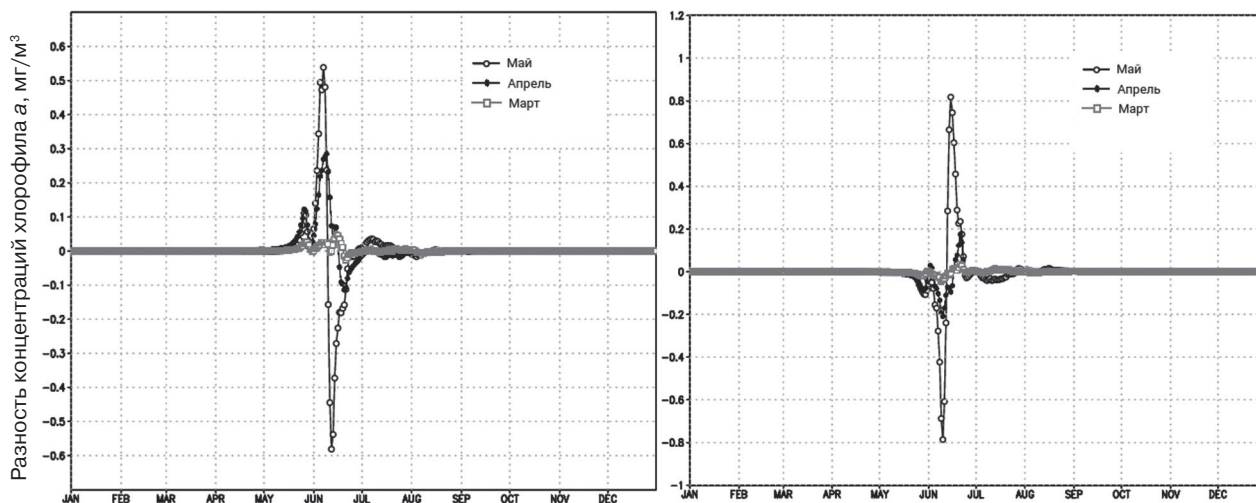


Рис. 1. Разница между осредненной по поверхности моря среднесуточной концентрацией хлорофилла *a* для теплого (слева) и холодного (справа) года

Fig 1. The difference between the surface- and daily average concentration of chlorophyll *a* for the warm (left) and cold (right) years

ле 2–4 °С. В Мезенском заливе около 0 °С. Распределения августа похожи на июльские, а в сентябре – около 9 °С на всей акватории моря. В октябре практически по всему морю температура составляет 2–4 °С, в Горле около 5 °С. В ноябре температура поверхностного слоя 0–2 °С, в Онежском заливе отрицательные значения. В декабре отрицательные значения температуры наблюдаются практически на всей акватории Белого моря.

Результаты исследования модельных данных свидетельствуют о решающем влиянии распределения майской температуры на последующее ее распределение в летние и осенние месяцы. Так, высокие значения температуры поверхностного слоя в мае сохраняются в течение всего лета и начала осени, а текущий год характеризуется значительным теплозапасом. Естественно, штормовые явления достаточно быстро разрушают установившуюся картину температурных полей, однако не могут в целом изменить среднемесячных показателей температуры.

Оценить влияние температуры воздуха на состояние моря позволяет численный эксперимент (рис. 1). Были смоделированы теплый и холодный месяцы: температура воздуха в течение месяца (март, апрель, май) одного года увеличена/уменьшена на 2 °С, а облачность уменьшена/увеличена на 20 % (использовались данные реанализа NCEP (<http://www.esrl.noaa.gov>)). В оставшиеся месяцы года температура не модифицировалась. Оценивались вариации всех переменных модели за этот измененный год. На рис. 1 пред-

ставлены графики отклика концентрации хлорофилла *a* в теплый период года на модифицированную температуру различных месяцев.

Результаты эксперимента показывают, что наиболее заметный отклик биогеохимических параметров стимулируется изменениями майской температуры (как при потеплении, так и при похолодании). Данные [Зимин, 2016] свидетельствуют, что именно в мае миграция фронтальных зон в Белом море достигает максимальных значений (в Двинском заливе до 70 км), а это в свою очередь ведет к быстрым перестройкам в морских экосистемах. Существенно, что график различия (рис. 1) имеет два пика: более ранней вспышке хлорофилла *a* соответствует и более раннее падение концентрации в июне, связанное со снижением биогенных элементов. Влияние майских изменений прослеживается практически до сентября включительно.

Рассмотрение модельных распределений по декадам (10 суток) свидетельствует, что ключевым периодом года, в котором закладывается характерная годовая динамика беломорских экосистем, вероятно, является период с 20 мая по 10 июня. Для проверки этой гипотезы требуется проведение дополнительных расчетов с привлечением большего количества измеренных значений температуры воды Белого моря и концентрации хлорофилла *a*.

Особенности температурного режима отражаются на внутригодовом распределении фитопланктона. Были проведены модельные расчеты по распределению хлорофилла *a* и первичной продукции. На рис. 2 показано

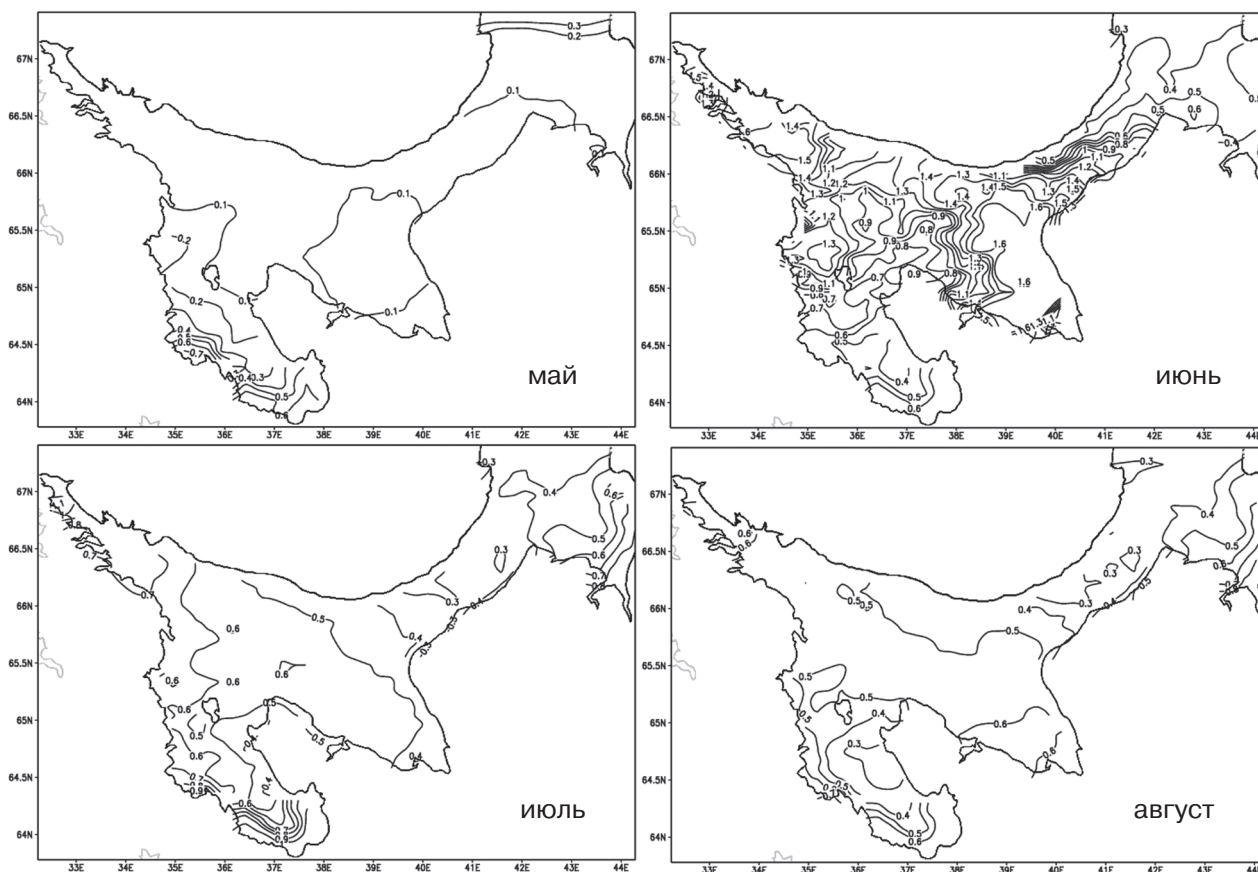


Рис. 2. Распределение модельного хлорофилла *a* в холодном 1994 г., в mg/m^3 . Поверхностный слой
 Fig 2. The distribution of model chlorophyll *a* concentration in the cold 1994, mg/m^3 . The surface layer

распределение хлорофилла *a* в поверхностном слое в холодном 1994 г., на рис. 3 – в теплом 2013 г.

При сравнении рис. 2 и 3 хорошо заметно, что наиболее быстрые изменения происходят от мая к июню. В это время сходит лед в Белом море, начинается прогрев поверхностного слоя, усиливается сток рек, приносящих пресную воду и биогенные элементы с водосбора. В период половодья проходит 60–80 % объема всего годового стока рек, впадающих в Белое море, на май при этом приходится 40 % годового стока для р. Северная Двина [Ресурсы..., 1972]. Естественно, что за этот месяц происходят глобальные изменения в экосистемах Белого моря в сезонном аспекте.

Видно (рис. 4), что май 1993 и 1994 года различается и по температуре, и по распределению хлорофилла *a*, аналогично и 2012 и 2013 гг. Отметим, что распределения апреля для этих лет и по температуре, и по хлорофиллу не содержат явных различий. События лета, таким образом, формируются в мае и прослеживаются до ранней осени. После зимы события предыдущего года как бы «забываются» системой, и после схода льда в Белом море

начинается новый цикл, скорость развития которого снова определяется процессами, происходящими в мае. Естественно, это видимая часть биогеохимических процессов, имеющая непосредственное отношение к однолетним организмам, хотя резонно предположить, что и для многолетних организмов события мая значимы.

При моделировании первичной продукции отмечаются следующие особенности. Весной максимум выражен в приустьевых участках моря – с повышенным содержанием биогенных элементов и относительно высокой температурой воды. Летом первичная продукция снижается, что связано с истощением запаса биогенных элементов [Бергер, 2007], например, это хорошо заметно в Онежском заливе. Осенью максимум относительно всей акватории наблюдается в Бассейне.

В теплый год количество продукции выше, и наиболее ярко это проявляется начиная с июня. В мае различия выражены еще не так сильно. Однако уже в июле распределение для холодного и теплого года снова становится похожим. В теплый год лишь в южной части Белого моря (особенно в Двинском заливе) продук-

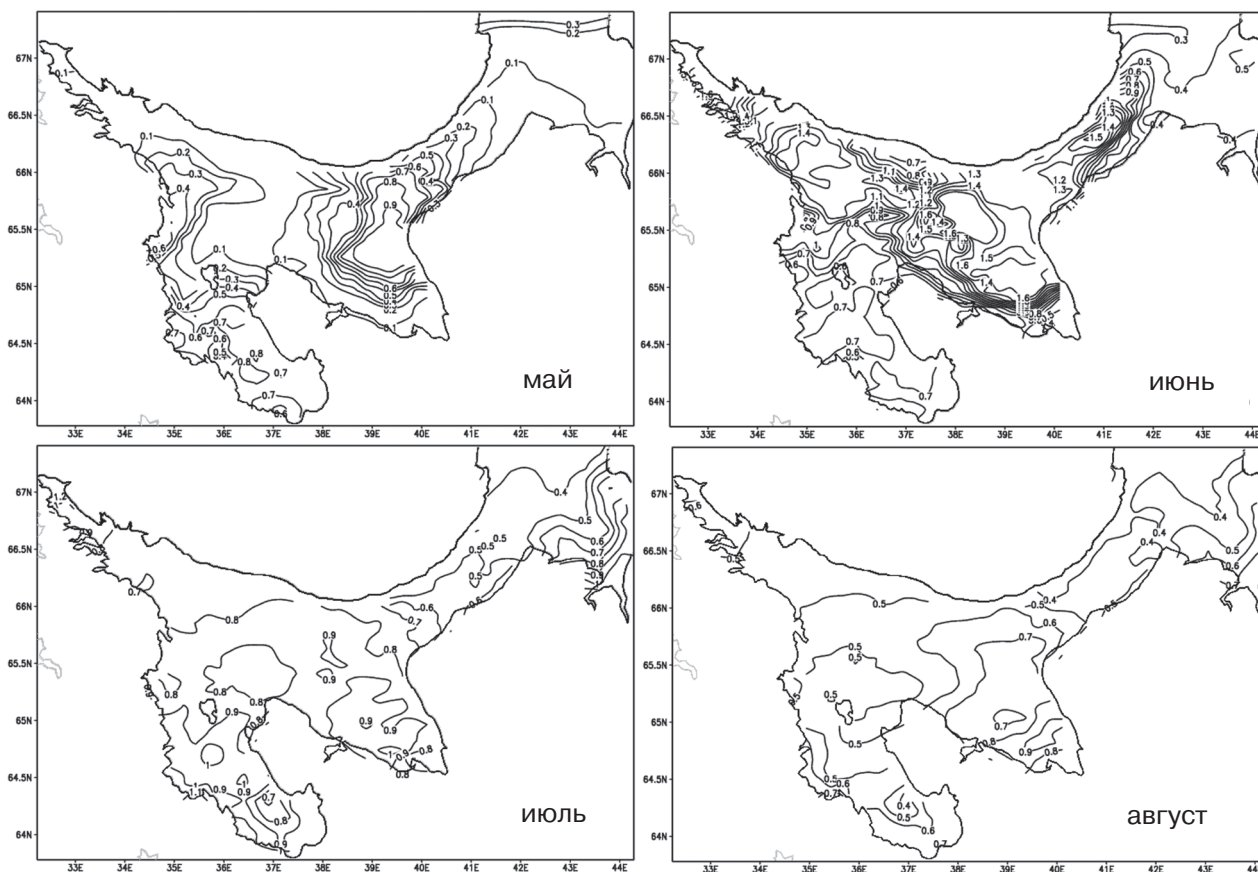


Рис. 3. Распределение модельного хлорофилла *a* в теплом 2013 г., в mg/m^3 . Поверхностный слой
 Fig 3. The distribution of model chlorophyll *a* concentration in the warm 2013, mg/m^3 . The surface layer

ция выше. Наиболее продуктивными являются заливы Белого моря, что хорошо согласуется с литературными данными [Бергер, 2007; Белое..., 2007].

Заключение

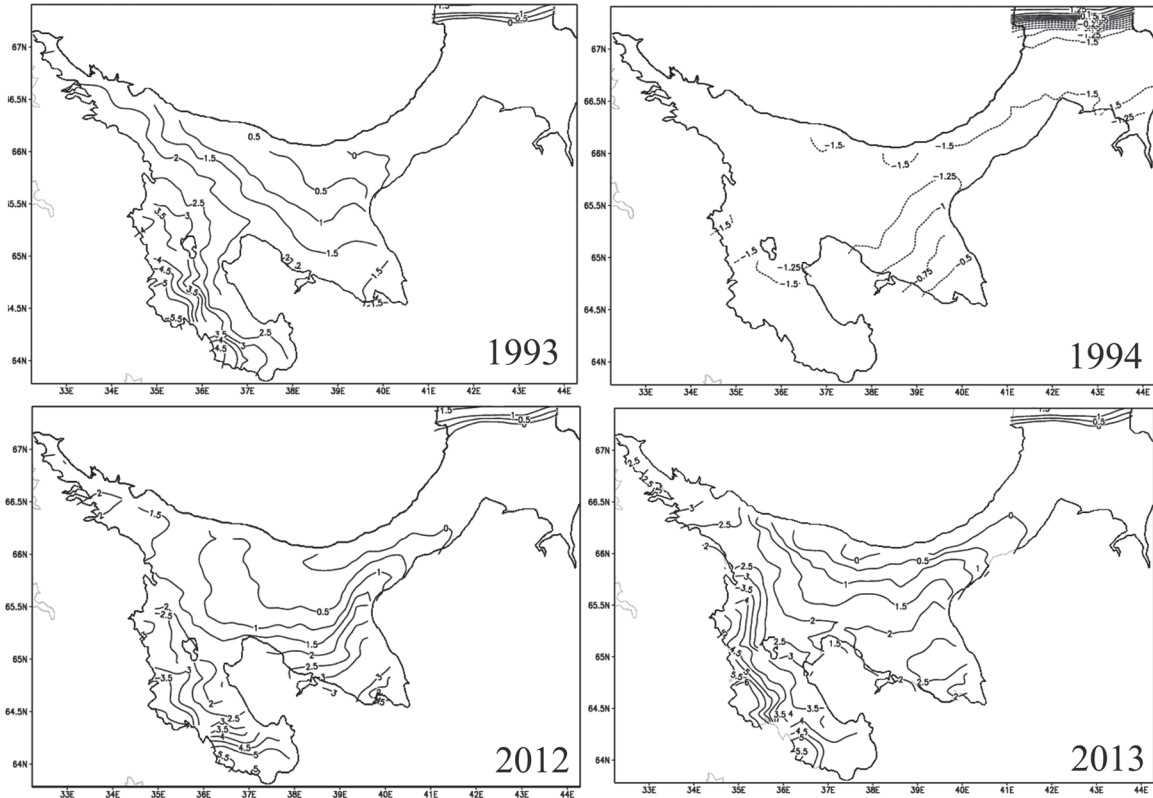
Возможности программного комплекса JAS-MINE и объем репрезентативных данных по Белому морю за многолетний период [Толстикова и др., 2010; Usov et al., 2013; База...] помогают ответить на вопрос, что происходит с экосистемами моря в теплый, холодный или средний год, как изменяются сроки цветения фитопланктона, первичная продукция.

На проявление теплых, холодных и средних лет в биогеохимических процессах Белого моря влияют макроциркуляционные процессы, одним из которых является Северо-Атлантическое колебание, или NAO (North Atlantic Oscillation) [Серяков, 1979; Смирнов и др., 1998]. NAO характеризуется разностью давления между Исландским минимумом и Азорским максимумом, а это в свою очередь влияет на интенсификацию западного переноса и перераспределение тепла и влаги в Северном полушарии

[Смирнова и др., 2001; Мирвис и др., 2009; Астафьева, Раев, 2010]. Различные события NAO (положительные и отрицательные) соответствуют положительным и отрицательным периодам в температуре поверхностного слоя Белого моря. Например, в индексах NAO и температуре поверхностного слоя Белого моря синхронно прослеживаются теплый 1989 г. и холодный 1978 г. [Толстикова, 2016]. По данным В. Д. Бойцова [2008] для Баренцева моря, от которого во многом зависит водообмен Белого моря, также выделяются холодные 1978 и 1979 годы, а после 1988 г. наступил теплый период, что автор указанной работы связывает с NAO. В работе [Диксон, Майнке, 2005] показано, что NAO влияет на три основных параметра, обуславливающих океаническую циркуляцию: 1) скорость ветра; 2) скрытый и явный потоки тепла; 3) испарение или осадки.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания КарНЦ РАН «Закономерности изменений экосистем Белого моря при интенсификации освоения Арктической зоны региона и под влиянием изменений климата», № АА-АА-18-118032290034-5.

Температура в мае



Хлорофилл а в мае

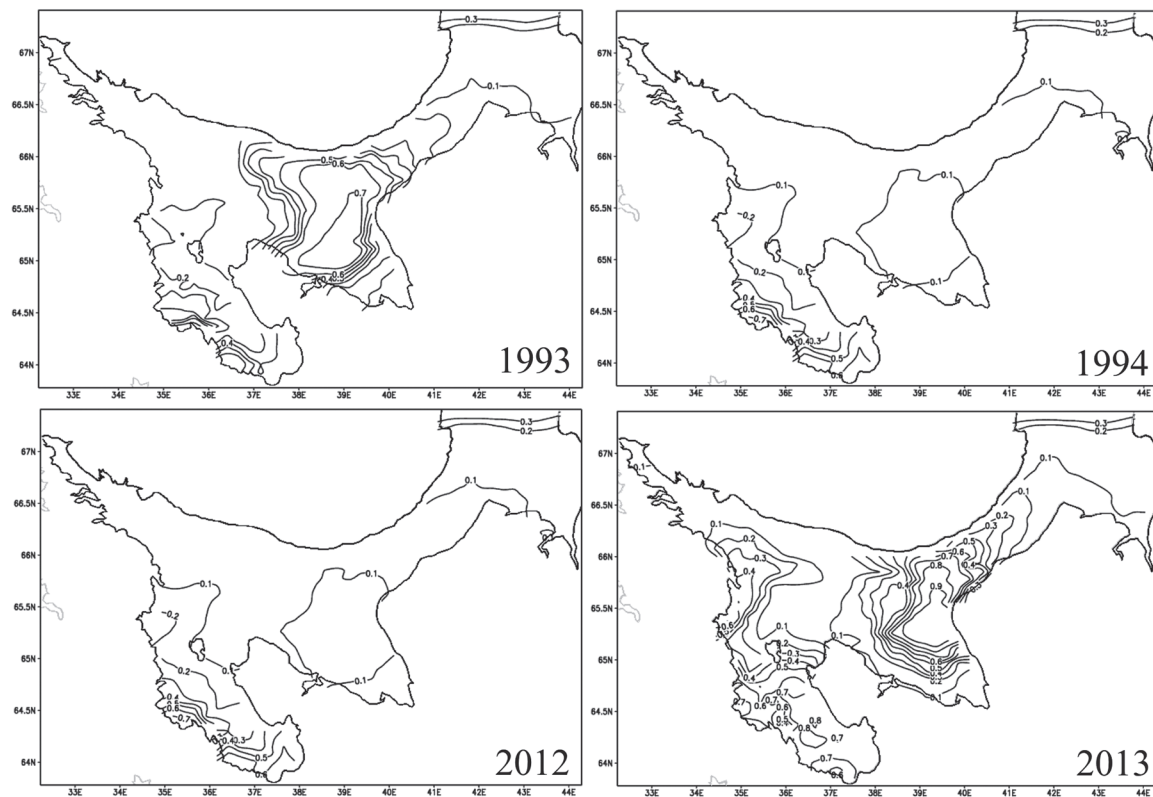


Рис. 4. Распределение модельной температуры поверхностного слоя и модельного хлорофилла а в мае в разные годы

Fig. 4. The distribution of the model temperature of the surface layer and model chlorophyll a concentration in May in different years

Литература

Астафьева Н. М., Раев М. Д. Влияние крупномасштабного удаленного атмосферного окружения на траектории тропических циклонов // Современ. проблемы дистанц. зондирования Земли из космоса: Физ. основы, методы и технологии мониторинга окружающей среды, потенциально опасных явлений и объектов. 2010. Т. 7, № 1. С. 61–74.

База данных ЗИН РАН [Электронный ресурс]. URL: <http://www.st.nmfs.noaa.gov/corpop/time-series/ru-10101/> (дата обращения: 10.12.2018).

Белое море и его водосбор под влиянием климатических и антропогенных факторов / Под ред. Н. Н. Филатова, А. Ю. Тержевика. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 335 с.

Бергер В. Я. Продукционный потенциал Белого моря. Исследования фауны морей. СПб.: ЗИН РАН, 2007. Т. 60(68). 292 с.

Бойцов В. Д. Долгопериодные колебания температуры воздуха в Северной Атлантике и Северо-Европейском бассейне // Изв. РГО. 2008. Т. 140, вып. 2. С. 6–11.

Диксон Р., Майнке Й. Океанографические условия Атлантики в 1998–1999 гг. и их постепенное восстановление после экстремальных воздействий // 100 лет океанографических наблюдений на разрезе «Кольский меридиан» в Баренцевом море: Сб. докл. междунар. симп. Мурманск: ПИНРО, 2005. С. 130–144.

Зимин А. В. Закономерности субмезомасштабных процессов и явлений в Белом море // Ученые записки РГГМУ. 2016. № 44. С. 104–120.

Коршунова Н. Н., Швець Н. В. Изменение норм основных климатических параметров на территории России за последние десятилетия // Труды ВНИИГМИ-МЦД. 2014. № 178. 125 с.

Мирвис В. М., Мелешко В. П., Гаврилина В. М., Матюгин В. А., Львова Т. Ю. Воспроизводимость Североатлантического колебания по результатам гидродинамических прогнозов на месяц и сезон, его предсказуемость и связь с качеством прогнозирования аномалий температуры воздуха на территории России // Тр. гл. геофиз. обсерватории им. А. И. Воейкова. 2009. Вып. 560. С. 7–33.

Политова Н. В., Филиппов А. С., Володин В. Д., Здоровеннов Р. Э., Зуйкова М. В., Зыкова О. А., Кравчишина М., Потапова И. Ю., Таскаев В. Р., Толстиков А. В., Яковлев А. Е. Комплексные исследования системы Белого моря в рейсе научно-исследовательского судна «Эколог» летом 2013 г. // Океанология. 2014. Т. 54, № 6. 855 с.

Ресурсы поверхностных вод СССР. Т. 3. Северный край. Л.: Гидрометеиздат, 1972. 664 с.

Серяков Е. И. Долгосрочные прогнозы тепловых процессов в Северной Атлантике. Л.: Гидрометеиздат, 1979. 168 с.

Смирнов Н. П., Воробьев В. Н., Качанов С. Ю. Северо-Атлантическое колебание и климат. СПб.: РГГМУ, 1998. 122 с.

Смирнова А. И., Терзиев Ф. С., Яковлева Н. П., Арсенчук М. О. Закономерности разномасштабной изменчивости элементов гидрометеорологического режима Белого моря, фоновые оценки их колебаний на современном этапе // Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря: материалы VIII регион. науч.-практ. конф. Беломорск, 2001. С. 22–29.

Толстиков А. В. Изменчивость температуры поверхностного слоя Белого моря. М.: ГЕОС, 2016. 212 с.

Толстиков А. В., Чернов И. А., Мурзина С. А., Мартынова Д. М., Яковлев Н. Г. Разработка комплекса Green JASMINE для изучения и прогнозирования состояния экосистем // Труды КарНЦ РАН. 2017. № 5. С. 23–32. doi: 10.17076/eb501

Толстиков А. В., Филатов Н. Н., Здоровеннов Р. Э. Белое море и его водосбор // Свид. о гос. рег. базы данных № 2010620435. 16 августа 2010 г.

Чернов И. А., Толстиков А. В., Яковлев Н. Г. Комплексная модель Белого моря: гидротермодинамика вод и морского льда // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 8. С. 116–128. doi: 10.17076/mat397

Яковлев Н. Г. Воспроизведение крупномасштабного состояния вод и морского льда Северного Ледовитого океана в 1948–2002 гг. Часть 1: Численная модель и среднее состояние // Изв. РАН. Физика атмосферы и океана. 2009. Т. 45, № 3. С. 1–16.

Biogeochemical Flux Model (BFM). URL: <http://bfm-community.eu> (дата обращения: 10.12.2018).

Chernov I., Lazzari P., Tolstikov A., Kravchishina M., Yakovlev N. Hydrodynamical and biogeochemical spatio-temporal variability in the White Sea: A modeling study // J. Mar. Syst. 2018. No. 187. P. 23–35.

Lazzari P., Solidoro C., Salon S., Bolzon G. Spatial variability of phosphate and nitrate in the Mediterranean Sea: A modeling approach // Deep Sea Res. Part I: Oceanogr. Res. Pap. 2016. Vol. 108. P. 39–52.

Usov N., Kutcheva I., Primakov I., Martynova D. Every species is good in its season: Do the shifts in the annual temperature dynamics affect the phenology of the zooplankton species in the White Sea? // Hydrobiologia. 2013. Vol. 706. P. 11–33.

Vichi M., Lovato T., Lazzari P., Cossarini G., Gutierrez Mlot E., Mattia G., Masina S., McKiver W. J., Pinar-di N., Solidoro C., Tedesco L., Zavatarelli M. The Biogeochemical Flux Model (BFM): equation description and user manual. BFM version 5.1. 2015. BFM Report series. N. 1. Release 1.1. July 2015. Bologna, Italy, 2015a. P. 104. URL: <http://bfm-community.eu> (дата обращения: 10.12.2018).

Vichi M., Lovato T., Gutierrez Mlot E., McKiver W. Coupling BFM with Ocean models: the NEMO model (Nucleus for the European Modelling of the Ocean). BFM Report series N. 2, Release 1.0, August 2015. Bologna, Italy, 2015b P. 31. URL: <http://bfm-community.eu> (дата обращения: 10.12.2018).

Поступила в редакцию 13.12.2018

References

- Astaf'eva N. M., Raev M. D. Vliyanie krupnomashtabnogo udalennogo atmosfernogo okruzheniya na traektorii tropicheskikh tsiklonov [The influence of large-scale remote atmospheric environments on tropical cyclone trajectories]. *Sovremen. problemy distants. zondirovaniya Zemli iz kosmosa: Fiz. osnovy, metody i tekhnologii monitoringa okruzhayushchei sredy, potentsial'no opasnykh yavlenii i ob'ektov* [Modern problems of remote sensing of the Earth from space: Phys. bases, methods and technologies for monitoring the environment, potentially dangerous phenomena and objects]. 2010. Vol. 7, no. 1. P. 61–74.
- Baza dannykh ZIN RAN [Database of the Zoological Institute, Russian Academy of Sciences]. URL: <http://www.st.nmfs.noaa.gov/copepod/time-series/ru-10101/> (accessed: 10.12.2018).
- Beloe more i ego vodosbor pod vliyaniem klimaticheskikh i antropogennykh faktorov [The White Sea and its catchment under the influence of climatic and man-induced factors]. Eds N. N. Filatov, A. Yu. Terzhevnik. Petrozavodsk: KarRC RAS, 2007. 335 p.
- Berger V. Ya. Produktionnyi potentsial Belogo morya. Issledovaniya fauny morei [Production potential of the White Sea. Study of marine fauna]. St. Petersburg: ZIN RAN, 2007. Vol. 60(68). 292 p.
- Boitsov V. D. Dolgoperiodnye kolebaniya temperatury vozdukh v Severnoi Atlantike i Severo-Evropeskom basseine [Long-period fluctuations of air temperature in the North Atlantic and North-European basin]. *Izv. RGO* [Proceed. Russ. Geographical Society]. 2008. Vol. 140, iss. 2. P. 6–11.
- Chernov I. A., Tolstikov A. V., Yakovlev N. G. Kompleksnaya model' Belogo morya: gidrotermodynamika vod i morskogo l'da [Comprehensive model of the White Sea: hydrothermodynamics of water and sea ice]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2016. No. 8. P. 116–128. doi: 10.17076/mat397
- Dickson R., Meinke J. Okeanograficheskie usloviya Atlantiki v 1998–1999 gg. i ikh postepennoe vosstanovlenie posle ekstremal'nykh vozdeistvii [Atlantic hydrography in 1998–1999: continued recovery from extreme forcing?]. *100 let okeanograficheskikh nablyudenii na razreze "Kolskii meridian" v Barentsevom more: Sb. dokl. mezhdunar. simp.* [100 years of oceanographic observations on the "Kola Meridian" section in the Barents Sea: Proceed. int. symp.]. Murmansk: PINRO, 2005. P. 130–144.
- Korshunova N. N., Shvets N. V. Izmenenie norm osnovnykh klimaticheskikh parametrov na territorii Rossii za poslednie desyatiletia [Change of main climatic parameters in Russia over the last decades]. *Trudy VNIIGMI-MCD* [Proceed. RIHMI-WDC]. 2014. No. 178. 125 p.
- Mirvis V. M., Meleshko V. P., Gavrilina V. M., Matyugin V. A., L'vova T. Yu. Vosproizvodimost' Severoatlanticheskogo kolebaniya po rezul'tatam gidrodinamicheskikh prognozov na mesyats i sezon, ego predskazyemost' i svyaz' s kachestvom prognozirovaniya anomalii temperatury vozdukh na territorii Rossii [Reproducibility of the North Atlantic Oscillation as derived in the monthly and seasonal forecasts, and its predict-
- ability and connection with quality of air temperature anomalies forecasts in Russia]. *Tr. glav. geofizich. observatorii im. A. I. Voeikova* [Proceed. Voeikov Main Geophysical Observatory]. 2009. Iss. 560. P. 7–33.
- Politova N. V., Filippov A. S., Volodin V. D., Zdorovenov R. E., Zuikova M. V., Zykova O. A., Kravchishina M. D., Potapova I. Yu., Taskaev V. R., Tolstikov A. V., Yakovlev A. E. Kompleksnye issledovaniya sistemy Belogo morya v reise nauchno-issledovatel'skogo sudna "Ekolog" letom 2013 g. [Comprehensive study of the White Sea system during the expedition of the research vessel "Ecolog" in summer 2013]. *Okeanologiya* [Ocenology]. 2014. Vol. 54, no. 6. 855 p.
- Resursy poverkhnostnykh vod SSSR. T. 3. Severnyi krai [Resources of the surface waters of the USSR. Vol. 3. Northern region]. Leningrad: Gidrometeoizdat, 1972. 664 p.
- Seryakov E. I. Dolgosrochnye prognozy teplovykh protsessov v Severnoi Atlantike [Long-term forecasts of thermal processes in the North Atlantic]. Leningrad: Gidrometeoizdat, 1979. 168 p.
- Smirnov N. P., Vorob'ev V. N., Kachanov S. Yu. Severo-Atlanticheskoe kolebanie i klimat [The North Atlantic Oscillation and climate]. St. Petersburg: RGGMU, 1998. 122 p.
- Smirnova A. I., Terziev F. S., Yakovleva N. P., Arsenchuk M. O. Zakonomernosti raznomashtabnoi izmenchivosti elementov gidrometeorologicheskogo rezhima Belogo morya, fonovye otsenki ikh kolebanii na sovremennom etape [Patterns of the various-scale variability of hydrometeorological regime elements of the White Sea, background estimates of their fluctuations at the present stage]. *Probl. izuch., rats. ispolzovaniya i okhrany prirod. resursov Belogo morya: Mat. VIII region. nauch.-prakt. konf.* [Probl. of studying, rational use and protection of nat. resources of the White Sea: Proceed. 8th reg. sci. pract. conf.]. Belomorsk, 2001. P. 22–29.
- Tolstikov A. V. Izmenchivost' temperatury poverkhnostnogo sloya Belogo morya [Variability of the surface layer temperature in the White Sea]. Moscow: GEOS, 2016. 212 p.
- Tolstikov A. V., Chernov I. A., Murzina S. A., Martynova D. M., Yakovlev N. G. Razrabotka kompleksa Green JASMINE dlya izucheniya i prognozirovaniya sostoyaniya ekosistem [Design and application of the Green JASMINE complex for the study and prediction of the ecosystems state and variability of the White Sea]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2017. No. 5. P. 23–32. doi: 10.17076/eb501
- Tolstikov A. V., Filatov N. N., Zdorovenov R. E. Beloe more i ego vodosbor. Svid. o gos. reg. bazy dannykh № 2010620435. 16 avgusta 2010 g. [The official registration certificate No. 2010620435 dated 16.08.2010 of the database The White Sea and its catchment].
- Yakovlev N. G. Vosproizvedenie krupnomashtabnogo sostoyaniya vod i morskogo l'da Severnogo Ledovitogo okeana v 1948–2002 gg. Chast' 1: Chislennaya model' i srednee sostoyanie [Reproduction of the large-scale state of water and sea ice in the Arctic Ocean from 1948 to 2002. Pt. 1. Numerical model and the average state]. *Izvestiya RAN, FAO* [Izvestiya, Atmospheric and Oceanic Physics]. 2009. Vol. 45, no. 3. P. 1–16.

Zimin A. V. Zakonomernosti submezomasshtabnykh protsessov i yavlenii v Belom more [Regularities of sub-mesoscale processes and phenomena in the White Sea]. *Uchenye zapiski RGGMU* [Proceed. RSHU]. 2016. No. 44. P. 104–120.

Biogeochemical Flux Model (BFM). URL: <http://bfm-community.eu> (accessed: 10.12.2018).

Chernov I., Lazzari P., Tolstikov A., Kravchishina M., Iakovlev N. Hydrodynamical and biogeochemical spatio-temporal variability in the White Sea: A modeling study. *J. Mar. Syst.* 2018. No. 187. P. 23–35.

Lazzari P., Solidoro C., Salon S., Bolzon G. Spatial variability of phosphate and nitrate in the Mediterranean Sea: A modeling approach. *Deep Sea Res. Part I: Oceanogr. Res. Pap.* 2016. Vol. 108. P. 39–52.

Usov N., Kutcheva I., Primakov I., Martynova D. Every species is good in its season: Do the shifts in the annual temperature dynamics affect the phenology

of the zooplankton species in the White Sea? *Hydrobiologia*. 2013. Vol. 706. P. 11–33.

Vichi M., Lovato T., Lazzari P., Cossarini G., Gutierrez Mlot E., Mattia G., Masina S., McKiver W. J., Pinar-di N., Solidoro C., Tedesco L., Zavatarelli M. The Biogeochemical Flux Model (BFM): equation description and user manual. BFM version 5.1. 2015. BFM Report series. N. 1. Release 1.1. July 2015. Bologna, Italy, 2015a. P. 104. URL: <http://bfm-community.eu> (accessed: 10.12.2018).

Vichi M., Lovato T., Gutierrez Mlot E., McKiver W. Coupling BFM with Ocean models: the NEMO model (Nucleus for the European Modelling of the Ocean). BFM Report series N. 2, Release 1.0, August 2015. Bologna, Italy, 2015b. P. 31. URL: <http://bfm-community.eu> (accessed: 10.12.2018).

Received December 13, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Толстиков Алексей Владимирович

руководитель лаб. географии и гидрологии, к. г. н.
Институт водных проблем Севера КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
пр. А. Невского, 50, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185030
эл. почта: alexeytolstikov@mail.ru
тел.: +79114022359

Чернов Илья Александрович

старший научный сотрудник лаб. моделирования
природно-технических систем, к. ф.-м. н.
Институт прикладных математических исследований
КарНЦ РАН, Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: iachernov@yandex.ru

CONTRIBUTORS:

Tolstikov, Aleksey

Northern Water Problems Institute, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
50 Al. Nevsky St., 185030 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: alexeytolstikov@mail.ru
tel.: +79114022359

Chernov, Ilya

Institute of Applied Mathematical Research,
Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: iachernov@yandex.ru

УДК 591.147.5:577.161:574.24:599.323.4

ВЛИЯНИЕ ПОСТОЯННОЙ ТЕМНОТЫ, МЕЛАТОНИНА И ЕГО АНТАГОНИСТА ЛУЗИНДОЛА НА СОДЕРЖАНИЕ РЕТИНОЛА И ТОКОФЕРОЛА У КРЫС

Т. Н. Ильина, И. В. Баишникова, Е. А. Хижкин

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

Постоянная темнота вызывает стимуляцию секреции эпифизарного гормона мелатонина. В измененных световых условиях интенсивность синтеза мелатонина, обладающего сильным антиоксидантным эффектом, может значительно меняться. При нахождении длительное время в полной темноте проявляется свободно текущий ритм секреции мелатонина, что оказывает влияние на состояние всей антиоксидантной системы. В работе исследовали влияние постоянной полной темноты, мелатонина и его рецепторного антагониста лузиндола на содержание ретинола и токоферола в тканях и органах взрослых самцов крыс. Крысы в возрасте 7 мес. были поделены на две группы и в течение 14 дней содержались в условиях постоянной темноты или стандартного освещения (контроль). Животные каждой группы были разделены на три подгруппы – контрольную и получавшие мелатонин или лузиндол в дозе 0,22 мг/кг веса. Содержание ретинола и токоферола определяли методом ВЭЖХ. Результаты исследования показали, что пребывание в темноте практически не повлияло на содержание токоферола и ретинола в тканях и органах крыс, а наибольшие изменения содержания витаминов А и Е под влиянием всех изучаемых факторов наблюдались в печени и скелетной мышце. Исследование показало, что отношения ретинола и токоферола с мелатонином в большинстве случаев носили взаимокompенсаторный характер, когда повышение содержания одного антиоксиданта индуцирует снижение другого, благодаря чему сохраняется динамическое равновесие антиоксидантной системы.

Ключевые слова: свет; антиоксиданты; витамины А и Е; циркадианные ритмы; мелатонин; лузиндол.

T. N. Ilyina, I. V. Baishnikova, E. A. Khizhkin. THE EFFECT OF CONSTANT DARKNESS, MELATONIN AND ITS ANTAGONIST LUZINDOLE ON RETINOL AND TOCOPHEROL IN RATS

Constant darkness stimulated the secretion of the pineal hormone melatonin. The intensity of melatonin synthesis, which has a strong antioxidant effect, can change significantly under changing light conditions. A free-running rhythm of melatonin secretion revealed in constant darkness affects the antioxidant system. In this study were investigated the effects of constant darkness, melatonin and its receptor antagonist luzindole on retinol and tocopherol contents in the tissues and organs of adult male rats. The rats (7 months old) were divided into two groups and kept in constant darkness (DD) or standard lighting (control, 12:12 LD) for 14 days. Animals of each group were divided into three subgroups: control, receiving melatonin 22 mg/kg of body weight or luzindole at a dose of 10 mg/l. The levels of retinol and tocopherol were determined by HPLC. The study showed that

staying in the dark did not affect the tocopherol and retinol content in rat tissues and organs. The greatest changes in the content of vitamins A and E under the influence of all the studied factors were observed in the liver and skeletal muscle. The relationship of retinol and tocopherol with melatonin in most cases had a mutually compensatory nature, i. e. an increase in the content of one antioxidant induced a decrease in another so that the dynamic balance of the antioxidant system was maintained.

Key words: light; antioxidants; vitamins A and E; circadian rhythms; melatonin; luzindole.

Введение

У млекопитающих многие физиологические процессы неразрывно связаны с циклическими изменениями общего уровня жизнедеятельности. Внутренние циркадные ритмы млекопитающих подчиняются смене дневных и ночных циклов окружающей среды. Полная постоянная темнота, как и постоянный свет, могут рассматриваться как форма экологического стресса [Ruby et al., 2002; Мичурина и др., 2005; Lee, 2007; Yuksel, 2008]. При отсутствии смены циклов циркадные часы свободно идут с периодом, близким к 24 часам. Цикл свет-темнота играет ключевую роль при определении уровня и продолжительности секреции нейрогормона эпифиза мелатонина, основной функцией которого является регуляция биологических ритмов. Биологическое действие мелатонина как гормона осуществляется благодаря наличию специфических рецепторов разной локализации и различных систем передачи сигнала в живой клетке [Hunt et al., 2001; Reiter et al., 2007; Das et al., 2010; Adamah-Biassi et al., 2013]. В реализации мембранотропных и геномных эффектов мелатонина участвуют рецепторы двух типов с разными функциональными свойствами, которые обнаруживают чувствительность к специфическим агонистам и антагонистам мелатонина. Синтетическим антагонистом мелатонина является блокатор его рецепторов лизиндол (*N*-acetyl-2-benzyltryptamine), обладающий похожей структурой, но имеющий дополнительную бензильную группу. Применение лизиндола, обладающего высоким сродством к рецепторам мелатонина, значительно ослабляет влияние гормона, а его действие имеет противоположную направленность по сравнению с мелатонином [Drazen et al., 2001; Budak et al., 2007; Requintina, Oxenkrug, 2007].

Эндогенный мелатонин – это сильный антиоксидант, и главным направлением его антиоксидантного действия является защита важнейших макромолекул клетки – ДНК, белков и липидов – от окислительного повреждения. Уровень мелатонина в организме оказывает

влияние на состояние всей антиоксидантной системы (АОС). При различных отклонениях от нормального функционирования организма может развиваться дисбаланс между интенсивностью продукции активных форм кислорода, свободно-радикального окисления и уровнем функциональной активности АОС. Кроме мелатонина существует большое количество других веществ, функционирующих как эффективные антиоксиданты, наиболее известными из которых являются витамины Е, С и β-каротин. Установлено, что мелатонин работает синергически с этими антиоксидативными агентами [Montilla et al., 2003; Меньщикова, 2006; Reiter et al., 2007].

Цель работы – исследование влияния мелатонина и его рецепторного антагониста лизиндола на содержание природных низкомолекулярных антиоксидантов ретинола и токоферола в тканях и органах крыс, содержащихся в постоянной темноте или в стандартных световых условиях.

Материалы и методы

В исследовании использовали самцов крыс Вистар (n=26) в возрасте 7 месяцев, которых разделили на две группы и в течение 14 суток содержали в разных световых условиях: 12:12 свет/темнота (контроль, LD) и полная постоянная темнота (DD). Крысы каждой группы были разделены на три подгруппы – контрольную и получавшие мелатонин (LD+мел, DD+мел) или лизиндол в дозе 0,22 мг/кг веса (LD+луз, DD+луз). Животных содержали в стандартных пластиковых клетках при температуре 24 ± 2 °С со свободным доступом к корму и воде. На 15-е сутки после начала эксперимента осуществляли эвтаназию животных методом декапитации в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 2010/63 EU (European Convention).

Содержание витаминов А (ретинол) и Е (α-токоферол) определяли в сыворотке, печени, почках, сердце и скелетной мышце методом ВЭЖХ. Стандартами служили α-токоферол

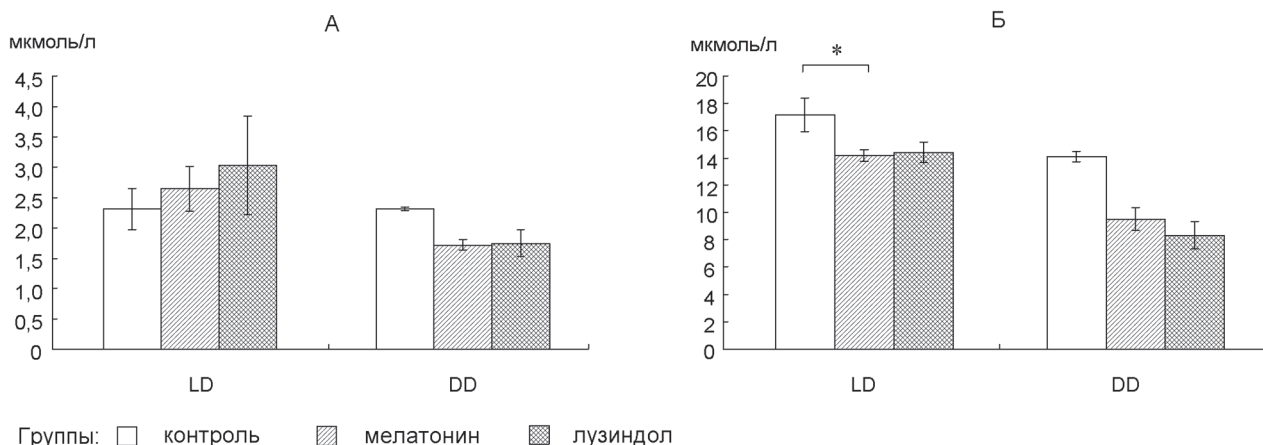


Рис. 1. Влияние светового режима, мелатонина и лузиндола на концентрацию ретинола (А) и токоферола (Б) в сыворотке крови крыс.

Здесь и далее: LD – стандартный световой режим (контроль); DD – постоянная темнота; * – разница между группами достоверна ($p < 0,05$); ** – разница между группами достоверна ($p < 0,01$)

Fig. 1. Effect of light regimes, melatonin and luzindole on the retinol (A) and tocopherol (Б) concentration in the rat serum.

Here and in Fig. 2 and 3: LD-standard lighting (control); DD – constant darkness; * – the difference between the groups is significant ($p < 0,05$); ** – the difference between the groups is significant ($p < 0,01$)

и ретинол фирмы Sigma (США). В скелетной мышце содержание витамина А было ниже пределов детекции, поэтому результаты исследования в этой ткани отсутствуют. Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики, сравнение между группами проводили с применением непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни. Исследования выполнены с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты и обсуждение

Результаты показали, что пребывание крыс в постоянной темноте не вызвало значительных изменений содержания токоферола и ретинола в тканях, а направленность и выраженность эффектов мелатонина и лузиндола на антиоксидантную систему при содержании в полной темноте и при стандартном освещении различались.

Изменение светового режима значительно не повлияло на концентрацию витамина А в сыворотке крови, однако действие препаратов проявилось в небольшом увеличении уровня ретинола при режиме LD и снижении при DD. Концентрация витамина Е в сыворотке крови крыс в группе DD была ниже по сравнению с LD. Мелатонин и лузиндол снижали содержание витамина Е в сыворотке крови при обоих свето-

вых режимах, причем в группе LD+мел изменения были достоверными (рис. 1).

В печени крыс DD среднее содержание α -токоферола было ниже, чем у крыс LD, на 34 %. Применение как лузиндола, так и мелатонина достоверно снижало уровень витамина Е при режиме LD. В то же время содержание ретинола в печени крыс DD было в два раза выше, чем в LD (рис. 2). Кроме того, при обоих режимах освещения содержание ретинола в подгруппах, получавших препараты, превышало контрольные значения.

У многих млекопитающих в почках, которые являются местом образования и удаления конечных продуктов обмена витамина А, содержание ретинола ниже, чем в печени. Такое же соотношение было выявлено в данном эксперименте. Применение лузиндола привело к увеличению в два раза содержания ретинола в почках крыс в группе DD+луз по сравнению с DD и LD, тогда как в группе LD+луз наблюдалось небольшое снижение. Использование мелатонина и лузиндола вызвало увеличение содержания токоферола в почках при обоих световых режимах, причем в большей степени это проявилось в группах с лузиндолом (рис. 3). Существенное увеличение содержания токоферола в почках крыс, получавших лузиндол, указывает, очевидно, на усиление выводящей функции и связанной с этим нагрузкой на орган. Видимо, поэтому применение лузиндола привело к увеличению уровня токоферола в почках при обоих световых режимах.

Содержание крыс в постоянной темноте практически не отразилось на уровне витаминов E и A в сердечной мышце. Применение препаратов при режиме LD не вызвало существенных изменений содержания витамина E, тогда как в группе DD+луз уровень токоферола снизился по сравнению с DD на 52 %, а в группе

DD+мел, напротив, наблюдалось его небольшое увеличение. Изменения в сердце не носили достоверный характер, но очевидно, что при режиме DD наиболее значительные изменения содержания токоферола и ретинола связаны с применением лузиндола и увеличение уровня мелатонина в условиях полной темноты ослабляется действием его антагониста. Так, если действие обоих препаратов не оказало заметного влияния при стандартном освещении, то совместное действие постоянной темноты и лузиндола снижало содержание токоферола в два раза. Изменения витамина A в сердечной мышце при DD носили противоположный характер – в группе DD+луз содержание ретинола несколько увеличивалось, что подтверждает наличие реципрокной связи между двумя витаминами.

В скелетной мышце применение мелатонина и лузиндола привело к достоверным изменениям содержания α -токоферола при стандартном освещении. Интересно отметить, что и эндогенный мелатонин, и лузиндол достоверно увеличивали содержание токоферола в скелетной мышце, хотя и в разной степени. Препараты не оказывали значительного влияния на содержание витамина E при режиме DD, хотя в группе DD+луз токоферол снижался на 20 % по сравнению с DD.

Практически во всех исследованных тканях было отмечено изменение содержания витаминов A и E, хотя не все из них носили достоверный характер. Имеются сведения, что свет оказывает свое влияние еще какое-то время после помещения крыс в условия полной темноты. Этот период постепенно удлиняется до стабилизации как минимум в 50 дней [Pitrosky et al., 1999]. Продолжительность нашего исследования была меньше, и, возможно, поэтому не все эффекты могли быть выражены явно.

Свет окружающей среды является потенциальным модулятором циркадианного ритма и экспрессии часовых генов. Одним из уровней взаимосвязи света и метаболизма является гормональный контроль, что связано с метаболическими функциями гормонов, циркадианном ритмом гормональной секреции и сетевой природой гормональной системы [Чернышева и др., 2012]. Постоянная темнота рассматривается как свободный ход циркадных ритмов. В условиях полной темноты проявляется свободно текущий ритм секреции мелатонина, который составляет приблизительно 25 ч. У сезонных животных мелатонин является одним из гормонов, уровень которых изменяется в зависимости от сезона года и действие которых отражается на многих функциях организма.

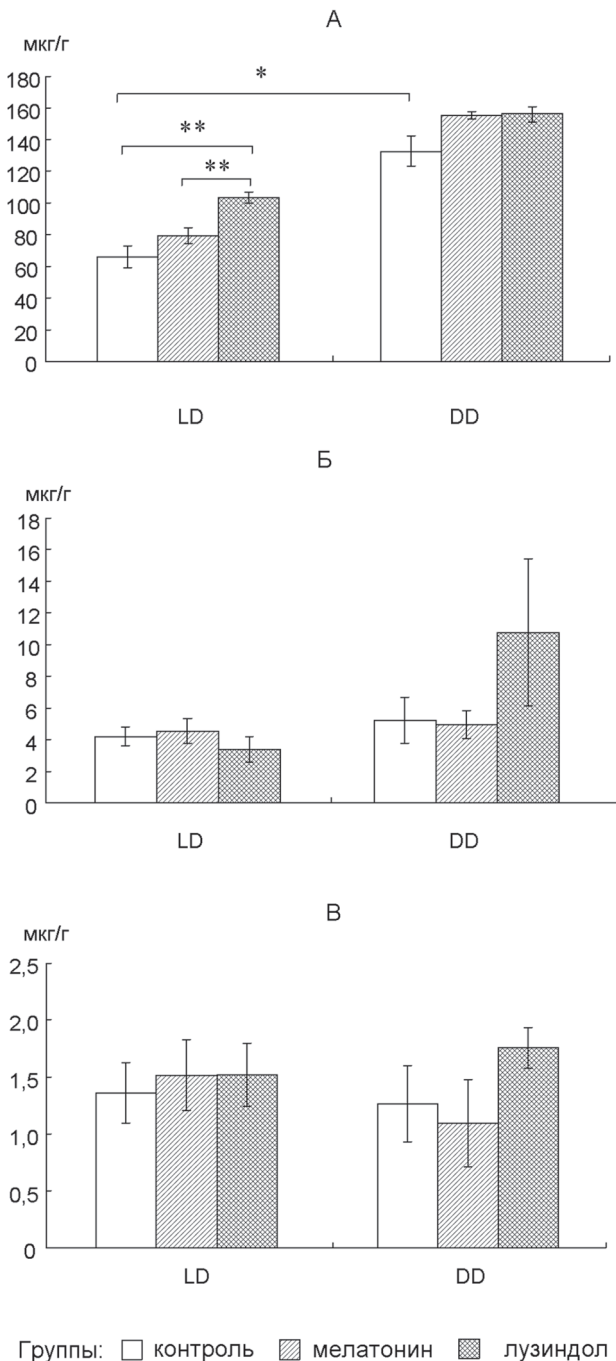


Рис. 2. Влияние светового режима, мелатонина и лузиндола на содержание ретинола в органах крыс:

A – печень; Б – почки; В – сердце

Fig. 2. Effect of light regimes, melatonin, and luzindole on the retinol content in rat organs:

A – liver; Б – kidney; В – heart

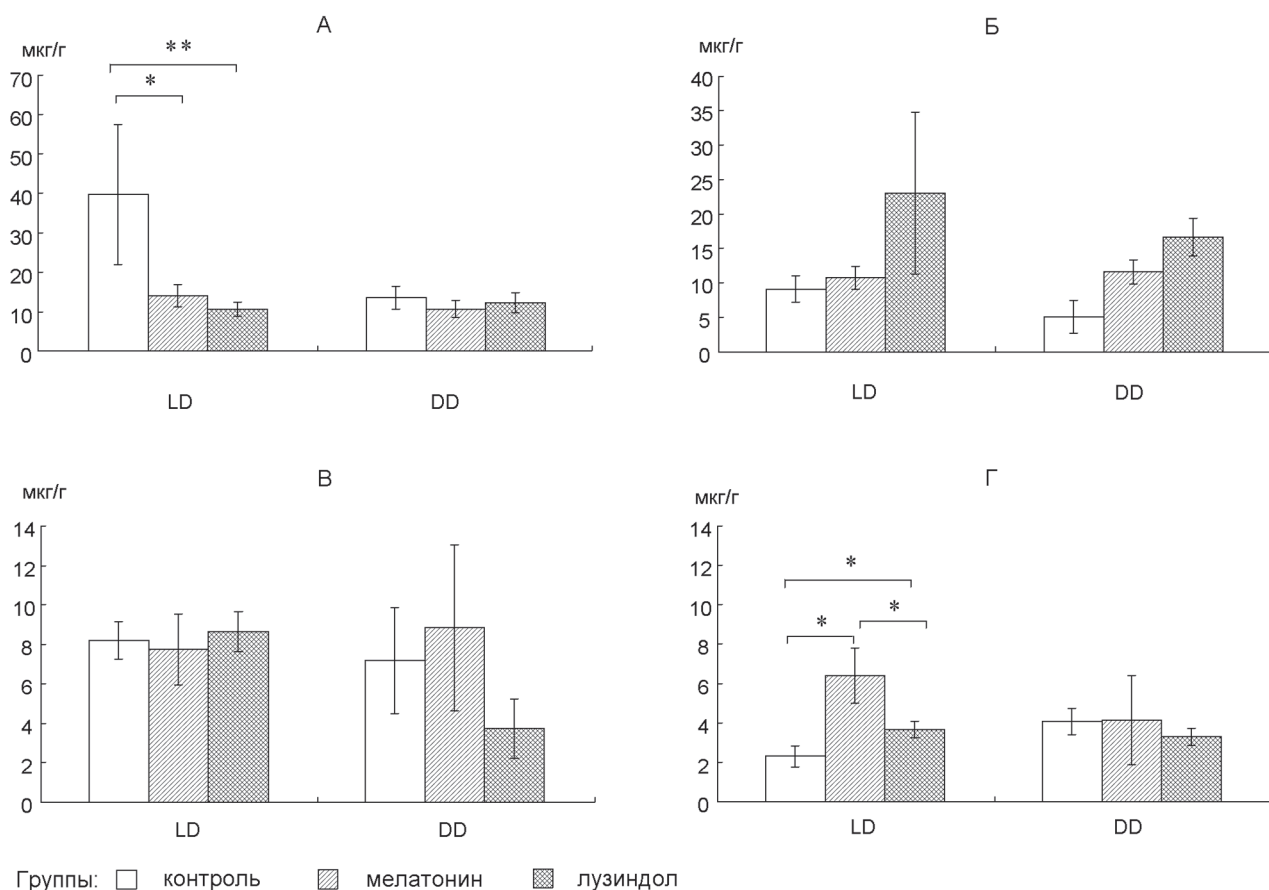


Рис. 3. Влияние светового режима, мелатонина и лузиндола на содержание токоферола в органах и тканях крыс:

А – печень; Б – почки; В – сердце; Г – скелетная мышца

Fig. 2. Effect of light regimes, melatonin, and luzindole on the tocopherol content in rat organs and tissues:

А – liver; Б – kidney; В – heart; Г – skeletal muscle

Размножение крыс не зависит от фотопериода, что делает вид модельной системой, позволяющей манипулировать мелатонином экзогенно и эндогенно, так как эти животные демонстрируют циркадные колебания секреции гормона, а не его сезонный ритм. В то же время крысы ведут ночной образ жизни, однако циркадианный ритм секреции мелатонина у них такой же, как у человека.

В лабораторных условиях цикл жизни крыс обычно происходит при стандартном освещении. Было выявлено, что при нахождении в постоянной темноте у крыс значительно снижается холестерин и глюкоза в сыворотке крови [Arasteh et al., 2010]. Циркадная экспрессия ферментов, участвующих в катаболизме жира, обнаружена во многих периферических органах мышей при DD, но не при стандартном освещении LD, что может быть ассоциировано с гипометаболическим поведением, как, например, гибернация и оцепенение [Lee, 2007]. Так, гены проколипазы мышей и панкреатический липа-

зосвязанный белок включаются в циркадный ритм в периферических органах при постоянной темноте DD, а не при цикле свет-темнота [Zhang et al., 2006]. Липаза, помимо расщепления жиров и жирных кислот, также расщепляет жирорастворимые витамины А, D, Е, К.

Мелатонин не накапливается в эпифизе, его транспортной формой является сывороточный альбумин, который переносит гормон в кровяное русло и другие биологические жидкости. Свою активность у млекопитающих мелатонин теряет в печени, где исчезает из кровообращения в результате гидроксирования с последующим выведением; в других органах мелатонин проходит реакцию деацетилирования [von Gall et al., 2002]. Хотя мелатонин синтезируется в основном эпифизом, также его могут вырабатывать и другие органы, но в значительно меньшем количестве. Так, секретирующие его клетки обнаружены в сетчатке глаза, желудочно-кишечном тракте, дыхательных путях, поджелудочной железе, надпочечниках и других

органах [Меньщикова и др., 2006]. Считается, что экстрапинеальная секреция мелатонина не подвергается циркадианному ритму, однако в последнее время появляются сведения о существовании возможных взаимосвязей между пинеальной и экстрапинеальной секрецией мелатонина. Широкое распространение мелатонина в жизненно важных органах отражает его активное участие в регуляции процессов гомеостаза [Reiter et al., 2007].

Гормональное действие мелатонина, включающее регуляцию циркадных ритмов, реализуется через клеточные рецепторы. После освобождения из связанного с альбумином состояния мелатонин взаимодействует со специфическими мембранными и ядерными рецепторами, которые являются путями для проведения сигнала. Группа мембранных рецепторов мелатонина включает в себя подтипы MT_1 , MT_2 и MT_3 , которые обладают высоким сродством к своему лиганду и обнаружены в супрахиазматическом ядре, гипоталамусе, гиппокампе, коре больших полушарий и мозжечке. Ядерные рецепторы к мелатонину относятся к семейству так называемых орфановых ядерных ретиноидных рецепторов ROR/RZR [Becker-André et al., 1997; Masana et al., 2007]. Важно отметить, что ядерные рецепторы обнаружены в трех принципиальных органах млекопитающих, определяющих суточные ритмы организма: в сетчатке глаза, эпифизе и в супрахиазматическом ядре, главной физиологической ролью которого является согласование по частоте и фазе ритмов между собой и с циклом свет-темнота. Экспериментально показана критичность наличия рецепторов ряда гормонов, в том числе и мелатонина, для работы церебрального clock-механизма [Чернышева и др., 2012; Adamah-Biassi et al., 2013].

Витамины А и Е обладают множеством биологических функций и играют важную роль в метаболических процессах. Так, метаболиты ретинола транс-ретиноевая и 9-цис-ретиноевая кислота являются лигандами ядерных рецепторов RORa, которые связываются с промоторной областью генов окситоцина и накапливающегося ночью белка циркадианного clock-механизма PER 1, активируя транскрипцию первого и подавляя транскрипцию второго у взрослых грызунов. При введении ретинола самкам мышей на пренатальной стадии формирования циркадианного clock-механизма часовых генов было отмечено увеличение содержания первого белка часовых генов PER1 в ядре эмбрионов, а у беременных самок крыс – рост PER1 в цитоплазме гипоталамуса [Чернышева и др., 2012]. Ядерные рецепторы связывают-

ся непосредственно с ДНК и активируют гены с помощью специфических нейтральных молекул, которые влияют на рецепторы поведения, половые гормоны, и в том числе на действие витаминов А, Д и глюкокортикоидов.

В отличие от биоритмологических эффектов антиоксидантные свойства мелатонина не опосредованы через его рецепторы. Функциональная активность мелатонина как химического вещества включает детоксикацию активных форм кислорода и азота, а также других химически активных молекул, обусловленных развитием окислительного стресса. Усиление в темноте функции образования мелатонина эпифизом может отражаться на уровне других антиоксидантов, действующих большей частью в комплексе [Reiter et al., 2000; Montilla et al., 2003; Меньщикова и др., 2006; Донцов и др., 2017]. При высокой концентрации мелатонин может действовать как поглотитель свободных радикалов, активных форм кислорода и реактивных форм азота. Однако при изучении антиоксидантных свойств мелатонина в разных экспериментальных системах получаются разноречивые результаты. Хотя имеются данные, что мелатонин лучше витамина Е ингибирует пероксильные радикалы, *in vitro* он слабо препятствовал развитию процессов ПОЛ в гомогенатах мозга крыс. Гормон менее эффективно по сравнению с витамином Е угнетал Cu^{2+} -индуцированное окисление липопротеинов низкой плотности; мелатонин слабее, чем витамин Е, ингибировал окислительную модификацию липопротеинов и снижал их захват макрофагами. В то же время на модели гемолиза эритроцитов, вызванного пероксильными радикалами, было показано, что мелатонин является более эффективным протектором, чем витамин Е, аскорбиновая кислота и восстановленный глутатион [Pieri et al., 1995; Меньщикова и др., 2006].

Лузиндол является антагонистом мембранных рецепторов мелатонина MT_1 и MT_2 с высоким сродством к подтипу MT_2 [Hunt et al., 2001; Reiter et al., 2007; Pashalieva et al., 2012; Rosen et al., 2012]. Лузиндол значительно снижает защитный эффект мелатонина во всех концентрациях. Путем блокирования активации мембранных рецепторов мелатонина лузиндол может полностью устранять защитное действие гормона при низкой концентрации. Однако при высокой концентрации мелатонина лузиндол снижает, но не полностью устраняет защитный эффект мелатонина при повреждении H_2O_2 . Так, предварительная обработка клеток ретинального пигментного эпителия лузиндолом показала снижение, но не полное

блокирование защитного эффекта мелатонина при высокой его концентрации, в связи с чем предполагают, что в фармакологических концентрациях мелатонин имеет прямой антиоксидантный эффект [Rosen et al., 2012]. Применение лизиндола в дозе 1 нмоль не мешало нейропротекторному эффекту введенного крысам мелатонина. Лизиндол при введении в одиночку не влиял на повреждения, произведенные хинолиновой кислотой, которая может увеличивать перекисное окисление липидов в гомогенатах мозга, и не блокировал защитное действие мелатонина. В то же время доля нейронов, выживших после совместного введения мелатонина и лизиндола, была немного больше, чем при использовании только одного мелатонина, хотя значения существенно не отличались от таковых у контрольных животных [Behan et al., 1999]. Результаты нашего эксперимента также показали, что в присутствии лизиндола содержание витаминов А и Е в исследованных тканях может как снижаться, так и увеличиваться.

Различные экспериментальные модели показывают, что некоторые из защитных эффектов мелатонина при окислительном стрессе не опосредованы рецепторами. Добавление *in vitro* лизиндола в культуру клеток нейробластомы за 20 мин до добавления мелатонина не вызывало изменений действия мелатонина при окислительном стрессе и активности антиоксидантных ферментов [Montilla et al., 2003]. Вводимый мышам после выключения света лизиндол вызывал увеличение уровня мелатонина в плазме крови. Не наблюдалось изменений концентрации мелатонина после приема антагониста, специфичного для подтипа MT_2 . Считают, что эти данные могут свидетельствовать о возможности контроля над высвобождением мелатонина, происходящим через рецептор MT_1 [Bedrosian et al., 2013]. В другом эксперименте показано, что мелатонин увеличивал функциональную активность тромбоцитов у крыс, в то время как лизиндол значительно уменьшал. Предварительное введение лизиндола снижало влияние эндогенного и экзогенного мелатонина [Pashalieva et al., 2012].

Хотя интерпретация результатов исследований с применением лизиндола вращается вокруг того, что он является антагонистом мелатонина, в то же время некоторые исследования показывают, что лизиндол имеет свою собственную функцию. Так, в исследованиях *in vitro* лизиндол ингибировал железо- и липополисахарид-индуцированную перекисную окисление липидов в мозге крыс и гомогенате почек, защищал фоторецепторы сетчатки глаза от повреждения

светом [Requintina, Oxenkrug, 2007]. В проведенных исследованиях лизиндол демонстрировал собственное антиапоптотическое действие. Считают, что результаты исследований представляют доказательства защитного эффекта лизиндола от стрессовых раздражителей, вследствие чего авторы высказывают мнение о возможности использования лизиндола как антиоксиданта. В нашем исследовании действие лизиндола приводило к разнонаправленным изменениям содержания ретинола и токоферола, которые зависели как от режима освещения, так и от вида ткани.

Заключение

Исследование показало, что содержание крыс в течение 14 суток в условиях постоянной темноты значительно не влияет на уровень токоферола и ретинола в их тканях и органах. Выявленное нами отсутствие изменений содержания ретинола и токоферола у крыс в темноте может быть следствием достаточного уровня витаминов и устойчивости низкомолекулярных антиоксидантов к рассматриваемой системе взаимодействий. Применение антагониста мелатонина лизиндола изменяло содержание витаминов А и Е в органах и тканях крыс в сторону как снижения, так и увеличения. Наибольшие изменения содержания токоферола выявлены в печени и скелетной мышце, а ретинола – в печени крыс. Отношения токоферола и ретинола с мелатонином в большинстве случаев носили взаимокompенсаторный характер, когда повышение содержания одного антиоксиданта индуцирует снижение другого, благодаря чему сохраняется динамическое равновесие антиоксидантной системы организма.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0073).

Литература

Донцов А. Е., Воспелъникова Н. Д., Зак П. П., Островский М. А. Антигликирующее действие мелатонина // ДАН. 2017. Т. 475, № 5. С. 588–591.

Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И. А., Круговых Н. Ф., Труфакин В. А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.

Мичурин С. В., Шурлыгина А. В., Белкин А. Д., Вакулин Г. М., Вербицкая Л. В., Труфакин В. А. Изменения печени и некоторых органов иммунной системы животных в условиях круглосуточного освещения // Морфология. 2005. Т. 128, № 4. С. 65–68.

- Чернышева М. П., Романова И. В., Михрина А. Л. Влияние ретинола на взаимодействие белка PERIOD 1, окситоцина и ГАМК в пренатальный период формирования циркадианного clock-механизма у крыс // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2012. Т. 4, № 5. С. 481–486.
- Adamah-Biassi E. B., Zhang Y., Jung H., Vissapragada S., Miller R. J., Dubocovich M. L. Distribution of MT1 melatonin receptor promoter-driven RFP expression in the brains of BAC C3H/HeN transgenic mice // J. Histochem. Cytochem. 2013. Vol. 62, no. 1. P. 70–84. doi: 10.1369/0022155413507453
- Arasteh A., Aliyev A., Khamnei S., Delazar A., Mesgari M., Mehmannaavaz Y. Investigation of the effects of the constant darkness and light on blood serum cholesterol, insulin and glucose levels in healthy male rats // Afr. J. Biotechnol. 2010. Vol. 9, no. 40. P. 6791–6796.
- Becker-André M., Wiesenberg I., Schaeren-Wiemers N., Andre E., Missbach M., Saurat J. H., Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 28531–28534 [published erratum appears in J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 16707].
- Bedrosian T. A., Herring K. L., Walton J. C., Finken L. K., Weil Z. M., Nelson R. J. Evidence for feedback control of melatonin pineal secretion // Neurosci. Lett. 2013. Vol. 542. P. 123–125.
- Behan W. M. H., McDonald M., Darlington L. G., Stone T. W. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl // Brit. J. Pharmacol. 1999. Vol. 128. P. 1754–1760.
- Budak A. V., Sushko B. S., Limansky Yu. P., Parkhomenko N. T. Effects of melatonin and antagonists of MT1 and MT2 receptors on somatic pain induced within the fixed circadian rhythm // Neurophysiology. 2007. Vol. 39, no. 3. P. 222–226.
- Das A., McDowell M., Pava M. J., Smith J. A., Reiter R. J., Woodward J. J., Varma A. K., Ray S. K., Banik N. L. The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4.1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF- α toxicity involves membrane melatonin receptors // J. Pineal Res. 2010. Vol. 48, no. 2. P. 157–169. doi: 10.1111/j.1600-079X.2009.00739.x
- Drazen D. L., Bilu D., Bilbo S. D., Nelson R. J. Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated of luzindole, a melatonin receptor antagonist // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2001. Vol. 280. P. 1476–1482.
- Hunt A. E., Al-Ghoul W. M., Gillette M. U., Dubocovich M. L. Activation of MT 2 melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2001. Vol. 280. P. 110–118.
- Lee C. C. Constant darkness is a mammalian biological signal // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2007. Vol. 72. P. 287–291. doi: 10.1101/sqb.2007.72.051
- Masana M. I., Sumaya I. C., Becker-Andre M., Dubocovich M. L. Behavioral characterization and modulation of circadian rhythms by light and melatonin in C3H/HeN mice homozygous for the ROR β knockout // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2007. Vol. 292. P. 2357–2367.
- Montilla P., Feijóo M., Muñoz M. C., Muñoz-Castañeda J. R., Bujalance I., Túnez I. Effect of melatonin on the oxidative stress in N1E-115 cells is not mediated by mt₁ receptors // J. Physiol. Biochem. 2003. Vol. 59, no. 4. P. 263–268.
- Pashalieva I., Stancheva E., Decheva L., Nyagolov Y., Negrev N. Experimental data about melatonin effects on platelet count and functional activity // Comptes rendus de l'Académie Bulgare des Sciences. 2012. Vol. 65, no. 6. P. 855–860.
- Pieri C., Moroni F., Marra M., Marcheselli F., Recchioni R. Melatonin is an efficient antioxidant // Arch. Gerontol. Geriatr. 1995. Vol. 20. P. 150–165.
- Pitrosky B., Kirsch R., Malan A., Mocaer E., Pevet P. Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 1999. Vol. 277. P. 812–828.
- Reiter R. J. Melatonin: Lowering the high price of free radicals // News Physiol. Sci. 2000. Vol. 15, no. 5. P. 246–250.
- Reiter R. J., Tan D. X., Manchester L. C., Teron P. M., Flores L. J., Koppiseppi S. Medical implication of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions // Adv. Med. Sci. 2007. Vol. 52. P. 11–28.
- Requintina P. J., Oxenkrug G. F. Effect of luzindole and other melatonin receptor antagonists on iron- and lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro // Ann. NY Acad. Sci. 2007. Vol. 1122. P. 289–294.
- Rodriguez C., Mayo J. C., Sainz R. M., Antolin I., Herrera F., Martin V., Reiter R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin // J. Pineal Res. 2004. Vol. 36. P. 1–9.
- Rosen R. B., Hu Dan-Ning, Chen M., McCormick S. A., Walsh J., Roberts J. E. Effect of melatonin and its receptor antagonist on retinal pigment epithelial cells against hydrogen peroxide damage // Mol. Vis. 2012. Vol. 18. P. 1640–1648.
- Ruby N. F., Joshi N., Heller H. G. Constant darkness restores entrainment to phase-delayed Siberian hamsters // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2002. Vol. 283. P. 1314–1320.
- von Gall C., Stehle J. H., Weaver D. R. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction // Cell Tissue Res. 2002. Vol. 309. P. 151–162. doi: 10.1007/s00441-002-0581-4
- Yuksel S. Altered adrenomedullin levels of the rats exposed to constant darkness and light stress // J. Photobiol. B: Biol. 2008. Vol. 91. P. 20–23.
- Zhang J., Kaasik R., Blackburn M. R., Lee C. C. Constant darkness is a circadian metabolic signal in mammals // Nature. 2006. Vol. 439. P. 340–343. doi: 10.1038/nature04368

Поступила в редакцию 25.03.2019

References

Chernysheva M. P., Romanova I. V., Mikhrina A. L. Vliyanie retinola na vzaimodeistvie belka PEPIOD 1, oksitotsina i GAMK v prenatal'nyi period formirovaniya tsirkadianogo clock-mekhanizma u krysa [Effect of retinol on the interaction of PERIOD 1 protein, oxytotsin and GAMK in the prenatal period of formation of circadian clock mechanism in rats]. *Zhurn. evol. biokhim. i fisiol.* [J. Evol. Biochem. Physiol.]. 2012. Vol. 4, no. 5. P. 481–486.

Dontsov A. E., Vospel'nikova N. D., Zak P. P., Ostrovskii M. A. Antiglikiruyushchee deistvie melatonina [Anti-glycating effect of melatonin]. *DAN* [Proceed. RAS]. 2017. Vol. 475, no. 5. P. 588–591.

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

Michurina S. V., Shurlygina A. V., Belkin A. D., Vakulin G. M., Verbitskaya L. V., Trufakin V. A. Izmeneniya pecheni i nekotorykh organov immunnoi sistemy zhivotnykh v usloviyakh kruglosutochnogo osveshcheniya [Changes in the liver and some organs of the immune system of animals in conditions of round-the-clock lighting]. *Morfologiya* [Morphology]. 2005. Vol. 128, no. 4. P. 65–68.

Adamah-Biassi E. B., Zhang Y., Jung H., Vissapragada S., Miller R. J., Dubocovich M. L. Distribution of MT1 melatonin receptor promoter-driven RFP expression in the brains of BAC C3H/HeN transgenic mice. *J. Histochem. Cytochem.* 2013. Vol. 62, no. 1. P. 70–84. doi: 10.1369/0022155413507453

Arasteh A., Aliyev A., Khamnei S., Delazar A., Mesgari M., Mehmannaev Y. Investigation of the effects of the constant darkness and Light on blood serum cholesterol, insulin and glucose levels in healthy male rats. *Afr. J. Biotechnol.* 2010. Vol. 9, no. 40. P. 6791–6796.

Becker-Andre M., Wiesenberger I., Schaeren-Wiemers N., Andre E., Missbach M., Saurat J. H., Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 28531–28534 [published erratum appears in *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 16707]

Bedrosian T. A., Herring K. L., Walton J. C., Fonken L. K., Weil Z. M., Nelson R. J. Evidence for feedback control of melatonin pineal secretion. *Neurosci. Lett.* 2013. Vol. 542. P. 123–125.

Behan W. M. H., McDonald M., Darlington L. G., Stone T. W. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Brit. J. Pharmacol.* 1999. Vol. 128. P. 1754–1760.

Das A., McDowell M., Pava M. J., Smith J. A., Reiter R. J., Woodward J. J., Varma A. K., Ray S. K., Banik N. L. The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4.1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF- α toxicity involves membrane melatonin receptors. *J. Pineal Res.* 2010. Vol. 48, no. 2. P. 157–169. doi: 10.1111/j.1600-079X.2009.00739.x

Drazen D. L., Bilu D., Bilbo S. D., Nelson R. J. Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is at-

tenuated of luzindole, a melatonin receptor antagonist. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001. Vol. 280. P. 1476–1482.

Hunt A. E., Al-Ghoul W. M., Gillette M. U., Dubocovich M. L. Activation of MT 2 melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001. Vol. 280. P. 110–118.

Lee C. C. Constant darkness is a mammalian biological signal. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2007. Vol. 72. P. 287–291. doi: 10.1101/sqb.2007.72.051

Masana M. I., Sumaya I. C., Becker-Andre M., Dubocovich M. L. Behavioral characterization and modulation of circadian rhythms by light and melatonin in C3H/HeN mice homozygous for the ROR β knockout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007. Vol. 292. P. 2357–2367.

Montilla P., Feijóo M., Muñoz M. C., Muñoz-Castañeda J. R., Bujalance I., Túnez I. Effect of melatonin on the oxidative stress in N1E-115 cells is not mediated by mt $_1$ receptors. *J. Physiol. Biochem.* 2003. Vol. 59, no. 4. P. 263–268.

Pashalieva I., Stancheva E., Decheva L., Nyagolov Y., Negrev N. Experimental data about melatonin effects on platelet count and functional activity. *Comptes rendus de l'Académie Bulgare des Sciences.* 2012. Vol. 65, no. 6. P. 855–860.

Pieri C., Moroni F., Marra M., Marcheselli F., Rechioni R. Melatonin is an efficient antioxidant. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 1995. Vol. 20. P. 150–165.

Pitrosky B., Kirsch R., Malan A., Mocaer E., Pevet P. Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1999. Vol. 277. P. 812–828.

Reiter R. J. Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *News Physiol. Sci.* 2000. Vol. 15, no. 5. P. 246–250.

Reiter R. J., Tan D. X., Manchester L. C., Terron P. M., Flores L. J., Koppisevi S. Medical implication of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Adv. Med. Sci.* 2007. Vol. 52. P. 11–28.

Requintina P. J., Oxenkrug G. F. Effect of luzindole and other melatonin receptor antagonists on iron- and lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007. Vol. 1122. P. 289–294.

Rodriguez C., Mayo J. C., Sainz R. M., Antolin I., Herrera F., Martin V., Reiter R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* 2004. Vol. 36. P. 1–9.

Rosen R. B., Hu D.-N., Chen M., McCormick S. A., Walsh J., Roberts J. E. Effect of melatonin and its receptor antagonist on retinal pigment epithelial cells against hydrogen peroxide damage. *Mol. Vis.* 2012. Vol. 18. P. 1640–1648.

Ruby N. F., Joshi N., Heller H. G. Constant darkness restores entrainment to phase-delayed Siberian hamsters. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002. Vol. 283. P. 1314–1320.

von Gall C., Stehle J. H., Weaver D. R. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 2002. Vol. 309. P. 151–162. doi: 10.1007/s00441-002-0581-4

Yuksel S. Altered adrenomedullin levels of the rats exposed to constant darkness and light stress. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2008. Vol. 91. P. 20–23.

Zhang J., Kaasik R., Blackburn M. R., Lee C. C. Constant darkness is a circadian metabolic signal in mam-

mals. *Nature*. 2006. Vol. 439. P. 340–343. doi: 10.1038/nature04368

Received March 25, 2019

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

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

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

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
эл. почта: hizhkin84@mail.ru
тел.: (8142) 573107

CONTRIBUTORS:

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

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

Khizhkin, Evgeny

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: hizhkin84@mail.ru
tel.: (8142) 573107

УДК 599.742.21: 575.857: 57.088.7

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ СБОРА И КОНСЕРВАЦИИ НЕИНВАЗИВНЫХ ПРОБ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БУРОГО МЕДВЕДЯ (*URSUS ARCTOS* L.)

А. С. Кузнецова¹, К. Ф. Тирронен¹, Д. В. Панченко¹, Дж. Шрегель²,
Е. А. Хижкин¹

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

² Норвежский институт биоэкономических исследований, Сванвик, Норвегия

Показана возможность применения неинвазивного биологического материала в популяционно-генетических исследованиях крупных хищных млекопитающих на примере бурого медведя Кольско-Карельского региона. Сделана оценка эффективности методических приемов сбора и консервации проб. Материалом для исследования послужили 393 пробы экскрементов медведей, собранные на юге Мурманской области (Терский район) и в Республике Карелия. В лаборатории NIBIO Сванховд (Сванвик, Норвегия) выполнено выделение ДНК из образцов и проведено генетическое типирование по 8 микросателлитным локусам, в ходе которого были установлены генотипы 48 особей бурого медведя. Изучено влияние ряда факторов (способ консервации биологического материала, «свежесть» собранной пробы, композиция пищевых остатков и экспозиция биоматериала по отношению к солнечному свету) на сохранность ДНК в пробах и успешность получения генетического профиля особи. При совместной оценке изучаемых факторов достоверно значимое влияние на успешность амплификации имел состав пищевых остатков в пробе ($p < 0,05$). Установлено, что наличие ягод в экскрементах положительно влияет на консервацию молекулы ДНК и повышает результативность индивидуальной идентификации особи по микросателлитным локусам (наличие ПЦР-продуктов). Анализ каждого фактора независимо от остальных показал, что и «свежесть» собранной пробы, и метод ее консервации достоверно влияют на успешность амплификации и генотипирования. Наиболее пригодными для генетического анализа оказались пробы экскрементов, собранные в кратчайшие сроки после дефекации (свежие) и хранившиеся в солевом стабилизирующем растворе (Invitek). В результате исследования составлены рекомендации по использованию экскрементов животных в профильных генетических исследованиях.

Ключевые слова: бурый медведь; *Ursus arctos*; экскременты; неинвазивный сбор; метод; консервация; питание; выделение ДНК; микросателлитный анализ.

**A. S. Kuznetsova, K. F. Tirronen, D. V. Panchenko, J. Schregel,
E. A. Khizhkin. EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF SAMPLING AND
PRESERVING METHODS FOR NON-INVASIVE SAMPLES WHEN BROWN
BEAR POPULATION-GENETIC STUDIES ARE CONDUCTING**

The possibilities of using non-invasively sampled biological material to study the genetic diversity and status of the brown bear population in the European North of Russia are dis-

cussed. The effectiveness of sampling and preservation methods is evaluated. Fieldwork including non-invasive collection of biological material was carried out in the study area in spring, summer and autumn 2014–2016. The studied area covers the southeast of the Murmansk Region and the Republic of Karelia. 393 samples of bear feces were collected. We conducted DNA extraction from samples and genotyping with 8 microsatellite markers in the DNA laboratory of the NIBIO Svanhovd Research Station (Svanvik, Norway). 48 brown bear individuals were successfully identified. The influence of several factors (the preservation method, age of the collected sample, diet content and sun exposure) on the amplification success was studied. When we analyzed all factors together, only diet content had a significant effect on the amplification success ($p < 0.05$). The presence of berries in feces was found to have a positive effect on DNA and increased the effectiveness of genotyping. The analysis of each factor independently showed that both the 'freshness' of the sample and the method of its preservation significantly influenced the result of genotyping. Fresh feces and samples preserved in STOOL solution were the most suitable for genetic analysis. According to these results, recommendations for using noninvasively sampled biomaterial in population genetic studies are given.

Key words: brown bear; *Ursus arctos* L.; feces; non-invasive sampling; method; preservation; diet; DNA extraction; STR analysis.

Введение

Одним из основных инструментов современных популяционных исследований стал микросателлитный анализ. С его помощью производится идентификация отдельных особей, родственных взаимоотношений в семьях, отдельных группах или целых популяциях. Он применяется для оценки численности, определения области распространения вида, случаев межвидовой гибридизации и др. Микросателлитный анализ используется в популяционных исследованиях при изучении эффективного размера популяции, потока генов, структуры и генетического разнообразия [Schwartz et al., 1999, 2006; Kindberg, 2011; Swenson et al., 2011; Jansson et al., 2012].

Неинвазивный биологический материал (волосы, перья, конечные продукты метаболизма и т. д.) стал неотъемлемой частью многих генетических исследований, в том числе с использованием микросателлитных маркеров, и в последнее время широко применяется для решения различных научных задач [Reed et al., 1997; Wasser et al., 1997; Solberg et al., 2006; De Barba et al., 2010a; Kopatz et al., 2012, 2014; Bischof et al., 2016]. Данный подход имеет ряд преимуществ перед традиционными методами сбора проб. Он довольно прост в использовании, при этом позволяет избежать прямого контакта с животным, что минимизирует как степень воздействия на изучаемый объект, так и риски исследователей, например при работе с крупными хищниками, переносчиками опасных заболеваний и т. д. Неинвазивный сбор проб по сравнению с традиционными методами поиска и отлова животных обычно не требует су-

щественных материальных и трудовых затрат и позволяет получать достаточное количество биологических образцов для лабораторного анализа.

При работе с биоматериалом, бедным ДНК, таким как экскременты, существуют определенные сложности, вызывающие в дальнейшем ошибки генотипирования. Они связаны прежде всего с низким качеством и количеством ДНК объекта исследований, значительной примесью чужеродной ДНК (пищевых остатков, паразитов, бактерий и т. п.) и наличием ингибиторов полимеразной цепной реакции (ПЦР) [Kohn, Wayne, 1997; Taberlet et al., 1999]. Для преодоления обозначенных трудностей ряд научных коллективов провели оценку методических приемов сбора, хранения и обработки биоматериала [Frantzen et al., 1998; Solberg et al., 2006; Murphy et al., 2000, 2003, 2007; De Barba et al., 2010b; Panasci et al., 2011; Lonsinger et al., 2015; Chih-Chin Shih et al., 2017]. В ходе этих исследований были определены факторы, влияющие на качество и количество ДНК в пробе и процесс амплификации, а также предложены рекомендации по работе с неинвазивными образцами. Большинство работ выполнены в условиях эксперимента, когда животные находились в неволе под наблюдением, а все исследуемые параметры строго контролировались. В связи с этим предложенные рекомендации не универсальны и не всегда могут быть применены в полевых условиях, когда у исследователей отсутствует точная информация по основным характеристикам проб экскрементов: их «возрасту», составу пищевых остатков, степени и объему воздействия факторов внешней среды и т. д.

Поэтому в рамках исследования генетического разнообразия и структуры населения бурого медведя Кольско-Карельского региона с целью разработки рекомендаций для проведения аналогичных полевых работ мы рассмотрели и проанализировали некоторые методические приемы сбора и консервации неинвазивных проб. Основными задачами исследования стали: анализ влияния ряда факторов на успех генотипирования и оценка возможности использования неинвазивных подходов при сборе биоматериала.

Объектом исследования был бурый медведь – важный структурный элемент таежных биоценозов. Являясь самым крупным хищником Европейского Севера России, медведь представляет опасность для человека и домашнего скота. Помимо этого бурый медведь – один из главных ресурсных видов и популярный объект охоты. Все это обуславливает необходимость мониторинга населения вида, комплексного изучения его биологии и экологии для научно обоснованного управления популяцией. Немаловажную роль в этих исследованиях приобрели методы молекулярной биологии, широко и повсеместно применяемые в настоящее время в популяционных исследованиях.

Материалы и методы

Полевые работы, включающие неинвазивный сбор биологического материала, выполнялись в Терском районе Мурманской области и Республике Карелия весной, летом и осенью 2014–2016 гг. В работе в качестве биоматериала – источника ДНК использованы экскременты бурого медведя. Среднее количество дефекаций медведя за сутки в летнее время составляет 12–14, в весеннее и осеннее – 5–8 [Пажетнов, 1990], поэтому образцы в природе представлены в достаточном количестве, кроме того, они легко идентифицируемы. Сбор образцов проводили на маршрутах, совмещая с учетом медведей по следам, а также в местах частого появления зверей и их концентраций. При сборе биоматериала использовались два метода консервации: в стабилизирующем растворе (Stool Collection Tube, Invitek) и в гранулированном силикагеле (КСКГ ГОСТ 3956–76).

Всего за время четырех экспедиций было собрано 393 пробы экскрементов бурого медведя, которые хранились в силикагеле. Для оценки эффективности различных консервантов часть проб (n=24) были зафиксированы двумя способами (с помощью стабилизирующего солевого раствора и силикагеля). Каждую про-

бу помещали в герметичную 30-мл пробирку, заполненную консервантом, и сопровождали описанием, содержащим дату и координаты места сбора образца, визуальную оценку «свежести», условно подразделяющуюся на «прошлогодние», «старые», «относительно свежие», «свежие». Определению давности пробы способствовал и разбор состава экскрементов, позволявший определить спектр кормов медведя на момент дефекации, а соответственно, и приблизительный «возраст» пробы к моменту ее сбора. К «прошлогодным», таким образом, были отнесены пробы предшествующего года («перезимовавшие»), к «старым» – образцы с условной давностью более месяца. «Относительно свежими» считали пробы, собранные в течение месяца после дефекации, «свежими» – образцы от 0 до 7 дней. В описание пробы также включали состав пищевых остатков, который оценивался визуально, путем разбора на месте либо позднее в лаборатории. Важными характеристиками пищевого поведения зверя являются его эврифагия и постепенная смена кормов в течение года. Тем не менее основу его питания в изучаемом регионе составляет растительность. Остатки животной пищи встречены в основном в образцах, собранных весной, в то время как экскременты, содержащие растительные остатки, получены во все сезоны, но с преобладанием их в пищевом рационе в летнее и осеннее время [Тирронен и др., 2016]. Образцы по преобладанию тех или иных компонентов были разделены на несколько групп: «трава», «ягоды», «ягоды и трава», «плоды», «желуди», «трава и муравьи», «ягоды и муравьи», «ягоды, трава и муравьи», «ягоды и остатки позвоночных животных», «муравьи», «остатки позвоночных животных».

В зависимости от того, где биоматериал был собран по отношению к солнцу, ему присваивали условную характеристику «тень», «полутень», «солнце». До проведения генетического анализа образцы хранились в темном прохладном месте в течение 1–8 месяцев.

Выделение ядерной ДНК из экскрементов производили с помощью PSP Spin Stool DNA Plus Kit (Invitek) (система для сбора, транспортировки и хранения образцов экскрементов и последующей очистки ДНК) в соответствии с инструкцией производителя и протоколом, опубликованным в статье [Linacre et al., 2011]. ПЦР-амплификация проводилась согласно протоколу, описанному в статье [Andreassen et al., 2012]. Использовали 8 микросателлитных маркеров, разработанных для бурого медведя: Mu05, Mu09, Mu10, Mu23, G10L, Mu50, Mu51, Mu59 [Taberlet et al., 1997]. ПЦР прово-

дили в объеме 10 μ л, содержащем 1x PCR Gold буфер, 200 μ M dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 μ M каждого праймера, 1 ед. AmpliTaqGold ДНК полимеразы, 1x BSA и 1 μ л матричной ДНК. Протокол ПЦР: первоначальная денатурация при 95 °С в течение 10 минут, 35 циклов – 30 с при 94 °С, 30 с при 58 °С и 1 мин при 72 °С, финальная элонгация в течение 15 мин при 72 °С.

Капиллярный электрофорез осуществляли на генетическом анализаторе ABI 3130xl и ПЦР-продукты анализировались в GeneMapper 4.0 (ABI). Гомозиготные генотипы были подтверждены фрагментным анализом минимум в трех повторностях, а гетерозиготные – минимум в двух.

На основании результатов фрагментного анализа ПЦР-продуктов первых двух амплификаций (локусы Mu05/Mu23 или Mu09/Mu10) пробы с негативным результатом или с низким качеством были исключены из дальнейшего исследования.

Для оценки влияния изучаемых факторов на успешность индивидуальной идентификации особи бурого медведя по 8 микросателлитным локусам проведен одно- и многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA и MANOVA) в программе Statgraphics Plus 5.0. Статистически значимым влиянием фактора считали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения

На основании проведенного микросателлитного анализа ДНК идентифицированы 48 особей бурого медведя. Из всей совокупности образцов, законсервированных в силикагеле ($n=393$), генотип по 8 микросателлитным локусам удалось установить в 24 % случаев ($n=96$). В образцах, хранившихся как в силикагеле, так и в растворе ($n=24$), генетический профиль по всем изучаемым локусам установлен в 12 ($n=3$) и 46 ($n=11$) % проб соответственно.

В дальнейших анализах мы использовали только данные по пробам, хранившимся в силикагеле. Очевидно, свежесть образца имеет большое значение для успешности генетического анализа, и чем меньше времени прошло с момента дефекации до сбора биоматериала, тем выше его пригодность для исследований. Всего для оценки этого параметра были использованы результаты генотипирования 369 образцов, в остальных случаях ($n=24$) возраст собранной пробы был не определен. Полученные нами результаты показали, что из 32 % «свежих» ($n=195$) и 20 % «относительно свежих» проб ($n=103$) удалось получить ДНК, пригодную для дальнейшего микросателлитного анализа.

Доля проб с успешной амплификацией ДНК, выделенной из «старых» образцов, составила 11 % ($n=18$), в «прошлогодных» – 13 % ($n=53$). Большее количество «прошлогодных» образцов по сравнению со «старыми» объясняется тем, что они были собраны во время первой весенней экспедиции 2014 года, в последующем мы старались не производить сбор старых образцов, если свежие имелись в достаточном количестве.

В таблице представлены результаты определения генотипа бурого медведя по 8 микросателлитным локусам для образцов, дифференцированных на группы по преобладающему пищевому компоненту в пробе. Общее число проб, проанализированных по данному параметру, составило 385, в оставшихся образцах ($n=8$) состав не был определен. Наиболее пригодными для анализа оказались экскременты, состоявшие главным образом из различных ягод и плодов деревьев (яблоня, черноплодная и дикая рябина), в то время как в пробах с преобладанием травянистых остатков наблюдалась крайне низкая результативность генотипирования.

Из проб с характеристикой «тень» ($n=12$) идентифицировать особь бурого медведя удалось в 33 % ($n=4$) случаев, а из образцов, собранных в «полутени» ($n=63$) и на «солнце» ($n=128$), в 17 ($n=12$) и 23 ($n=28$) % соответственно. Всего присвоенной характеристикой обладали 203 образца.

Сохранность ДНК в пробе и успешность амплификации зависят от типа консерванта. Выполненный нами однофакторный дисперсионный анализ показал достоверно значимое влияние этого фактора ($F = 8,80$; $p = 0,0048$).

Для оценки влияния факторов свежести, состава экскрементов и освещенности на успех генотипирования мы провели многофакторный дисперсионный анализ. Оказалось, что при совместном анализе параметров только состав пищевых остатков в пробе достоверно значим ($F = 2,82$; $p = 0,0014$).

Анализируя каждый фактор независимо от остальных, мы установили, что свежесть пробы имела достоверное влияние на успех генотипирования ($F = 4,35$; $p = 0,0050$). Наши результаты показали, что чем короче временной промежуток между моментом дефекации и сбором образца, тем идентификация особи успешнее (рис., а). Состав пищевых остатков также оказывал значимое воздействие ($F = 2,98$; $p = 0,0002$), при этом достоверно наилучший результат генотипирования был отмечен в ягодных пробах ($F = 10,38$; $p = 0,0014$) (рис., б), тогда как травяные образцы оказа-

Успешность получения генотипа бурого медведя по 8 микросателлитным локусам в зависимости от состава остатков корма в экскрементах

The success of obtaining the brown bear genotype using 8 STR markers depending on the composition of food residues in the bear's feces

Преобладающий компонент Dominant component	Количество проб данного состава Number of samples	Доля определенных генотипов, абс. (%) Number of identified genotypes, abs. (%)
трава grass	162	23 (14)
ягоды berries	87	31 (36)
трава и муравьи grass and ants	39	7 (18)
ягоды и трава berries and grass	27	7 (27)
плоды fruits	26	13 (50)
ягоды и муравьи berries and ants	10	7 (70)
ягоды и остатки позвоночных животных berries and vertebrates	9	1 (11)
ягоды, трава и муравьи berries, grass and ants	8	2 (25)
остатки позвоночных животных vertebrates	8	2 (25)
муравьи ants	5	0 (0)
желуди acorns	4	1 (25)

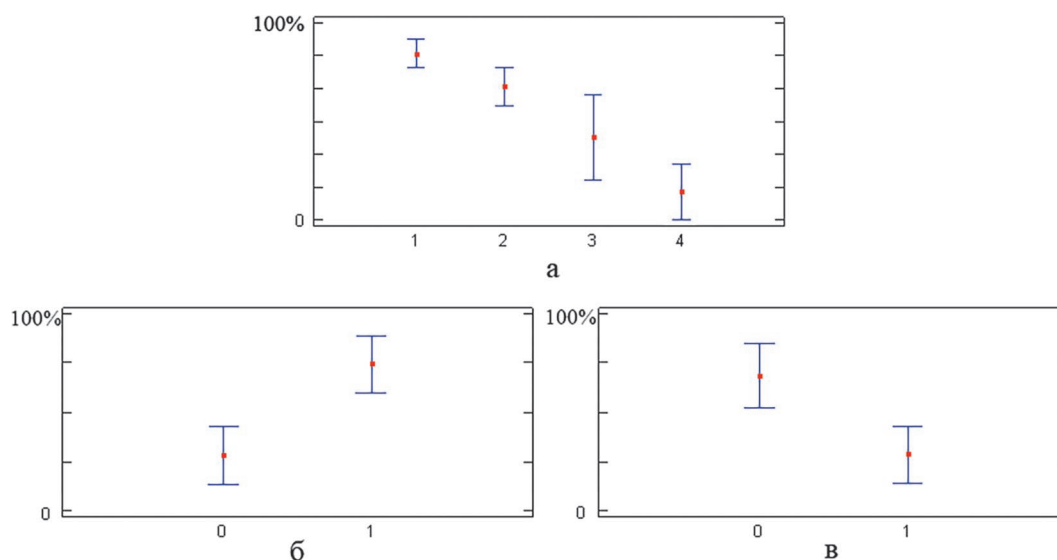
лись малопригодными для выделения ДНК и ее дальнейшего анализа ($F = 5,88$; $p = 0,0158$) (рис., в).

Выбор консерванта – одна из главных задач исследования, основанного на использовании биоматериала, бедного ДНК. Он должен быть простым и удобным в использовании и транспортировке и обладать высокими консервирующими характеристиками. Авторы работы [Wasser et al., 1997] предлагали в качестве идеальной альтернативы методам заморозки и хранения образца в стабилизирующих буферах применение силикагеля. Результаты нашего исследования показали лучшую сохранность ДНК в пробах, хранившихся в стабилизирующем солевом растворе, по сравнению с силикагелем. Согласно инструкции производителя, пробы, законсервированные таким образом, 3 месяца могут храниться при комнатной температуре, что применительно в полевых условиях, также сам раствор содержит стабилизатор ДНК, который инактивирует ДНКазы и предотвращает деградацию ДНК.

Несмотря на предполагаемое существенное влияние фактора «свежести» пробы на сохранность ДНК в ней, его значимость была выявлена только при однофакторном анализе. Вероятно, это объясняется тем, что до самой процедуры выделения ДНК образцы хранились

в консерванте длительный промежуток времени, и даже в тех пробах, которые были собраны условно в первый день с момента дефекации, могло произойти разрушение ДНК. Дегградация ДНК в результате воздействия комплекса внешних факторов делает «старые» образцы малопригодными для исследования. Возникает вопрос о целесообразности использования таких проб с учетом высоких финансовых затрат на выделение ДНК и генетический анализ в тех случаях, когда в полевых условиях существует возможность сбора свежего биоматериала в достаточном объеме. Однако важно отметить, что ДНК удалось получить даже из некоторой части прошлогодних, «перезимовавших» проб, хотя некоторые авторы говорят о непродуктивности использования проб давностью более 5 дней [Piggott, 2004; Santini et al., 2007; Panasci et al., 2011]. Наши исследования показали, что при правильном выборе консерванта, условий хранения и протокола для выделения возможно выделение ДНК из очень старых образцов.

В ходе исследования подтверждено предполагаемое влияние состава пищи на успешность выделения ДНК из экскрементов и амплификацию, что также отмечено в ряде других работ [Murphy et al., 2003; Panasci et al., 2011]. Возможно, лучшая сохранность ДНК в ягодных пробах объясняется наличием природных консер-



Влияние факторов «свежесть» (а) и «состав пищевых остатков» (б, в) на успешность идентификации бурого медведя по 8 микросателлитным локусам (MANOVA анализ выполнен в Statgraphics Plus 5.0).

По оси Y: доля проб с успешной идентификацией генотипа (%);

(а) по оси X: 1 – свежие образцы, 2 – относительно свежие, 3 – старые, 4 – прошлогодние;

(б) по оси X: 0 – ягоды отсутствовали, 1 – пробы, содержащие остатки ягод;

(в) по оси X: 0 – травяная растительность отсутствовала, 1 – пробы травяного состава

The influence of ageing factor and diets on the success of the identification of brown bears genotype.

Y-axis: the number of samples with identified brown bear individuals (%);

(а) on the X-axis: 1 – fresh samples, 2 – relatively fresh, 3 – old, 4 – last year samples;

(б) on the X-axis: 0 – berries were absent, 1 – samples containing residues of berries;

(в) on the X-axis: 0 – grass was absent, 1 – samples with grass

вантов в их составе [Panasci et al., 2011], тогда как крайне низкий успех генотипирования ДНК из проб травяного состава, возможно, связан с наличием в них ингибиторов ПЦР, о чем также упоминают некоторые авторы [Kohn, Wayne, 1997].

Еще одним фактором, способным оказать воздействие на молекулу ДНК, является солнечный свет, а именно УФ-излучение. В нашем исследовании доказать его достоверное воздействие на успех амплификации не удалось. Изучение негативного воздействия УФ-излучения проводится в контролируемых условиях эксперимента, и повреждения ДНК определяются с помощью специальных методов (высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС)) [Ravanat et al., 2001]. Все пробы в нашем исследовании получены в ходе полевых работ и характеристика солнечной экспозиции места сбора проб присвоена без точного определения негативного воздействия УФ-излучения на молекулу ДНК в образце, поэтому разделение проб по заданному параметру выполнено весьма условно, вследствие чего реальная оценка влияния анализируемого фактора не была произведена.

Заключение

Анализ воздействия различных факторов на сохранность ДНК объекта исследований в экскрементах позволяет рекомендовать при использовании неинвазивного биоматериала следующие позиции: 1) наиболее пригодным консервирующим агентом следует признать специализированный стабилизирующий солевой раствор; 2) для успешного выделения ДНК и амплификации рекомендуется использовать образцы, содержащие ягоды, а благоприятным временем сбора проб является период активного плодоношения этих растений; 3) использование наиболее свежих образцов при наличии биоматериала в достаточном количестве. Включение в исследования старых образцов возможно при недостатке свежего биоматериала, а также при целенаправленной оценке ряда экологических параметров вида.

Несмотря на низкую в некоторых случаях результативность генотипирования, мы считаем целесообразным использование экскрементов в качестве источника ДНК при проведении различных генетических исследований. Такой подход не несет в себе избирательного характера,

и данные, получаемые с помощью неинвазивно собираемого биоматериала, способны отразить реальную демографическую структуру и актуальное состояние изучаемой популяции. Кроме того, такой биоматериал активно используется во всех популяционно-генетических исследованиях. Оптимизация метода сбора проб, а также их правильное хранение до процедуры выделения ДНК позволяют повысить качество конечных результатов исследования, не увеличивая материальные затраты.

Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0080) и средств РФФИ (проект № 18-05-00646).

Литература

- Пажетнов В. С. Бурый медведь. М.: Агропромиздат, 1990. 215 с.
- Тирронен К. Ф., Панченко Д. В., Кузнецова А. С. Новые данные о питании бурого медведя (*Ursus arctos*) Карелии и юга Кольского полуострова // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 12. С. 114–122. doi: 10.17076/eco513
- Andreassen R., Schregel J., Kopatz A., Tobiasen C., Knappskog P. M., Hagen S. B., Kleven O., Schneider M., Kojola I., Aspi J., Rykov A., Tirronen K. F., Danilov P. I., Eiken H. G. A forensic DNA profiling system for Northern European brown bears (*Ursus arctos*) // Forensic Sci. Int. Genet. 2012. Vol. 6(6). P. 798–809. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.03.002
- Bischof R., Gregersen E. R., Brøseth H., Ellegren H., Flagstad Ø. Noninvasive genetic sampling reveals intraspecific territoriality in wolverines // Ecol. Evol. 2016. Vol. 6(5). P. 1527–1536. doi: 10.1002/ece3.1983
- Chih-Chin Shih, Sung-Lin Wu, Mei-Hsiu Hwang, Ling-Ling Lee. Evaluation on the effects of ageing factor, sampling and preservation methods on Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) noninvasive DNA amplification // Taiwan. 2017. Vol. 62(4). P. 363–370. doi: 10.6165/tai.2017.62.363
- De Barba M., Waits L. P., Garton E. O., Genovesi P., Randi E., Mustoni A., Groff C. The power of genetic monitoring for studying demography, ecology and genetics of a reintroduced brown bear population // Mol. Ecol. 2010a. Vol. 19. P. 3938–3951. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04791.x
- De Barba M., Waits L. P., Genovesi P., Randi E., Chirichella R., Cetto E. Comparing opportunistic and systematic sampling methods for non-invasive genetic monitoring of a small translocated brown bear population // J. Appl. Ecol. 2010b. Vol. 47. P. 172–181. doi: 10.1111/j.1365-2664.2009.01752.x
- Frantzen M. A., Silk J. B., Ferguson J. W., Wayne R. K., Kohn M. H. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA // Mol. Ecol. 1998. Vol. 7, no. 10. P. 1423–1428. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00449.x
- Jansson E., Ruokonen M., Kojola I., Aspi J. Rise and fall of a wolf population: genetic diversity and structure during recovery, rapid expansion and drastic decline // Mol. Ecol. 2012. Vol. 21. P. 5178–5193. doi: 10.1111/mec.12010
- Kindberg J., Swenson J., Ericsson G., Bellemain E., Miquel C., Taberlet P. Estimating population size and trends of the Swedish brown bear *Ursus arctos* population // Wildl. Biol. 2011. Vol. 17, no. 2. P. 114–123. doi: 10.2981/10-100
- Kohn M. H., Wayne R. K. Facts from feces revisited // Trends Ecol. Evol. 1997. Vol. 12, no. 6. P. 223–227.
- Kopatz A., Eiken H. G., Aspi J., Kojola I., Tobiasen C., Tirronen K. F., Danilov P. I., Hagen S. B. Admixture and gene flow from Russia in the recovering Northern European brown bear (*Ursus arctos*) // PLoS One. 2014. Vol. 9, iss. 5. P. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0097558
- Kopatz A., Eiken H. G., Hagen S. B., Ruokonen M., Esparza-Salas R., Schregel J., Kojola I., Smith P. E., Warttinen I., Aspholm P. E., Wikan S., Rykov A. M., Makarova O., Polikarpova N., Tirronen K. F., Danilov P. I., Aspi J. Connectivity and population subdivision at the fringe of a large brown bear (*Ursus arctos*) population in North Western Europe // Conserv. Genet. 2012. Vol. 13, no. 3. P. 681–692. doi: 10.1007/s10592-012-0317-2
- Linacre A., Gusmao L., Hecht W., Hellman A. P., Mayr W. R., Parson W., Prinz M., Schneider P. M., Morling N. ISFG: Recommendations regarding the use of nonhuman (animal) DNA in forensic genetic investigations // Forensic Sci. Int. Genet. 2011. Vol. 5. P. 501–505. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.10.017
- Lonsinger R. C., Gese E. M., Dempsey S. J., Kluever B. M., Johnson T. R., Waits L. P. Balancing sample accumulation and DNA degradation rates to optimize noninvasive genetic sampling of sympatric carnivores // Mol. Ecol. Resour. 2015. Vol. 15(4). P. 831–842. doi: 10.1111/1755-0998.12356
- Murphy M., Kendall K., Robinson A., Waits L. The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification // Conserv. Genet. 2007. Vol. 8. P. 1219–1224. doi: 10.1007/s10592-006-9264-0
- Murphy M., Waits L., Kendall K. Quantitative evaluation of fecal drying methods for brown bear DNA analysis // Wildl. Soc. Bull. 2000. Vol. 28, no. 4. P. 951–957. doi: 10.2307/3783853
- Murphy M., Waits L., Kendall K. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*) // Mol. Ecol. 2003. Vol. 12. P. 2261–2265. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01863.x
- Panasci M., Ballard W. B., Breck S., Rodriguez D., Liewellyn D., Densmore L. D., Wester D. B., Baker R. Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success // J. Wildl. Manag. 2011. Vol. 75. P. 1616–1624. doi: 10.1002/jwmg.221
- Piggott M. P. Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA // Wildl. Res. 2004. Vol. 31. P. 485–493. doi: 10.1071/WR03096
- Ravanat J. L., Douki T., Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2001. Vol. 63. P. 88–102.

Reed J. Z., Tollit D. J., Thompson P. M., Amos W. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces // *Mol. Ecol.* 1997. Vol. 6, no. 3. P. 225–234. doi: 10.1046/j.1365-294X.1997.00175.x

Santini A., Lucchini V., Fabbri E., Randi E. Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf (*Canis lupus*) excremental DNA samples // *Mol. Ecol. Notes.* 2007. Vol. 7. P. 955–961. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01829.x

Schwartz M. K., Luikart G., Waples R. S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management // *Trends Ecol. Evol.* 2006. Vol. 22, no. 1. P. 25–33. doi: 10.1016/j.tree.2006.08.009

Schwartz M. K., Tallmon D. A., Luikart G. Using genetics to estimate the size of wild populations: many methods, much potential, uncertain utility // *Anim. Conserv.* 1999. Vol. 2. P. 321–323. doi: 10.1111/j.1469-1795.1999.tb00079.x

Solberg K. H., Bellemain E., Drageset O. M., Taberlet P., Swenson J. E. An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus*

arctos) population size // *Biol. Conserv.* 2006. Vol. 128. P. 158–168. doi: 10.1016/j.biocon.2005.09.025

Swenson J., Taberlet P., Bellemain E. Genetics and conservation of European brown bears *Ursus arctos* // *Mamm. Rev.* 2011. Vol. 41, no. 2. P. 87–98. doi: 10.1111/j.1365-2907.2010.00179.x

Taberlet P., Waits L. P., Luikart G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap // *Trends Ecol. Evol.* 1999. Vol. 14, no. 8. P. 323–327. doi: 10.1016/j.jtcs.2018.08.053

Taberlet P., Camarra J. J., Griffin S., Uhres E., Hanotte O., Waits L. P., Dubois-Paganon C., Burke T., Bouvet J. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population // *Mol. Ecol.* 1997. Vol. 6. P. 869–876. doi: 10.1111/j.1365-294X.1997.tb00141.x

Wasser S. K., Houston C. S., Koehler G. M., Cadd G. G., Fain S. R. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids // *Mol. Ecol.* 1997. Vol. 6. P. 1091–1097. doi: 10.1046/j.1365-294X.1997.00281.x

Поступила в редакцию 26.03.2019

References

Pazhetnov V. S. Buryi medved' [Brown bear]. Moscow: Agropromizdat, 1990. 215 p.

Tirronen K. F., Panchenko D. V., Kuznetsova A. S. Novye dannye o pitanii burogo medvedya Karelii i yuga Kol'skogo poluostrova [New data on the diets of the brown bear (*Ursus arctos*) in Karelia and the south of the Kola Peninsula]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2016. No. 12. P. 114–122. doi: 10.17076/eco513

Andreassen R., Schregel J., Kopatz A., Tobiasen C., Knappskog P. M., Hagen S. B., Kleven O., Schneider M., Kojola I., Aspi J., Rykov A., Tirronen K. F., Danilov P. I., Eiken H. G. A forensic DNA profiling system for Northern European brown bears (*Ursus arctos*). *Forensic Sci. Int. Genet.* 2012. Vol. 6(6). P. 798–809. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.03.002

Bischof R., Gregersen E. R., Brøseth H., Ellegren H., Flagstad Ø. Noninvasive genetic sampling reveals intrasex territoriality in wolverines. *Ecol. Evol.* 2016. Vol. 6(5). P. 1527–1536. doi: 10.1002/ece3.1983

Chih-Chin Shih, Sung-Lin Wu, Mei-Hsiu Hwang, Ling-Ling Lee. Evaluation on the effects of ageing factor, sampling and preservation methods on Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) noninvasive DNA amplification. *Taiwania.* 2017. Vol. 62(4). P. 363–370. doi: 10.6165/tai.2017.62.363

De Barba M., Waits L. P., Garton E. O., Genovesi P., Randi E., Mustoni A., Groff C. The power of genetic monitoring for studying demography, ecology and genetics of a reintroduced brown bear population. *Mol. Ecol.* 2010a. Vol. 19. P. 3938–3951. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04791.x

De Barba M., Waits L. P., Genovesi P., Randi E., Chirichella R., Cetto E. Comparing opportunistic and systematic sampling methods for non-invasive genetic monitoring of a small translocated brown bear population. *J. Appl. Ecol.* 2010b. Vol. 47. P. 172–181. doi: 10.1111/j.1365-2664.2009.01752.x

Frantzen M. A., Silk J. B., Ferguson J. W., Wayne R. K., Kohn M. H. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Mol. Ecol.* 1998. Vol. 7, no. 10. P. 1423–1428. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00449.x

Jansson E., Ruokonen M., Kojola I., Aspi J. Rise and fall of a wolf population: genetic diversity and structure during recovery, rapid expansion and drastic decline. *Mol. Ecol.* 2012. Vol. 21. P. 5178–5193. doi: 10.1111/mec.12010

Kindberg J., Swenson J., Ericsson G., Bellemain E., Miquel C., Taberlet P. Estimating population size and trends of the Swedish brown bear *Ursus arctos* population. *Wildl. Biol.* 2011. Vol. 17, no. 2. P. 114–123. doi: 10.2981/10-100

Kohn M. H., Wayne R. K. Facts from feces revisited. *Trends Ecol. Evol.* 1997. Vol. 12, no. 6. P. 223–227.

Kopatz A., Eiken H. G., Aspi J., Kojola I., Tobiasen C., Tirronen K. F., Danilov P. I., Hagen S. B. Admixture and gene flow from Russia in the recovering Northern European brown bear (*Ursus arctos*). *PLoS One.* 2014. Vol. 9, iss. 5. P. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0097558

Kopatz A., Eiken H. G., Hagen S. B., Ruokonen M., Esparza-Salas R., Schregel J., Kojola I., Smith P. E., Warttinen I., Aspholm P. E., Wikan S., Rykov A. M., Makarova O., Polikarpova N., Tirronen K. F., Danilov P. I., Aspi J. Connectivity and population subdivision at the fringe of a large brown bear (*Ursus arctos*) population in North Western Europe. *Conserv. Genet.* 2012. Vol. 13, no. 3. P. 681–692. doi: 10.1007/s10592-012-0317-2

Linacre A., Gusmao L., Hecht W., Hellman A. P., Mayr W. R., Parson W., Prinz M., Schneider P. M., Morling N. ISFG: Recommendations regarding the use of nonhuman (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011. Vol. 5. P. 501–505. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.10.017

Lonsinger R. C., Gese E. M., Dempsey S. J., Kluever B. M., Johnson T. R., Waits L. P. Balancing sample

accumulation and DNA degradation rates to optimize noninvasive genetic sampling of sympatric carnivores. *Mol. Ecol. Resour.* 2015. Vol. 15(4). P. 831–842. doi: 10.1111/1755-0998.12356

Murphy M., Kendall K., Robinson A., Waits L. The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification. *Conserv. Genet.* 2007. Vol. 8. P. 1219–1224. doi: 10.1007/s10592-006-9264-0

Murphy M., Waits L., Kendall K. Quantitative evaluation of fecal drying methods for brown bear DNA analysis. *Wildl. Soc. Bull.* 2000. Vol. 28, no. 4. P. 951–957. doi: 10.2307/3783853

Murphy M., Waits L., Kendall K. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). *Mol. Ecol.* 2003. Vol. 12. P. 2261–2265. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01863.x

Panasci M., Ballard W. B., Breck S., Rodriguez D., Liewellyn D., Densmore L. D., Wester D. B., Baker R. Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success. *J. Wildl. Manag.* 2011. Vol. 75. P. 1616–1624. doi: 10.1002/jwmg.221

Piggott M. P. Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA. *Wildl. Res.* 2004. Vol. 31. P. 485–493. doi: 10.1071/WR03096

Ravanat J. L., Douki T., Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2001. Vol. 63. P. 88–102.

Reed J. Z., Tollit D. J., Thompson P. M., Amos W. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Mol. Ecol.* 1997. Vol. 6, no. 3. P. 225–234. doi: 10.1046/j.1365-294X.1997.00175.x

Santini A., Lucchini V., Fabbri E., Randi E. Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf

(*Canis lupus*) excremental DNA samples. *Mol. Ecol. Notes.* 2007. Vol. 7. P. 955–961. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01829.x

Schwartz M. K., Luikart G., Waples R. S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends Ecol. Evol.* 2006. Vol. 22, no. 1. P. 25–33. doi: 10.1016/j.tree.2006.08.009

Schwartz M. K., Tallmon D. A., Luikart G. Using genetics to estimate the size of wild populations: many methods, much potential, uncertain utility. *Anim. Conserv.* 1999. Vol. 2. P. 321–323. doi: 10.1111/j.1469-1795.1999.tb00079.x

Solberg K. H., Bellemain E., Drageset O. M., Taberlet P., Swenson J. E. An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. *Biol. Conserv.* 2006. Vol. 128. P. 158–168. doi: 10.1016/j.biocon.2005.09.025

Swenson J., Taberlet P., Bellemain E. Genetics and conservation of European brown bears *Ursus arctos*. *Mamm. Rev.* 2011. Vol. 41, no. 2. P. 87–98. doi: 10.1111/j.1365-2907.2010.00179.x

Taberlet P., Camarra J. J., Griffin S., Uhres E., Hannotte O., Waits L. P., Dubois-Paganon C., Burke T., Bouvet J. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Mol. Ecol.* 1997. Vol. 6. P. 869–876. doi: 10.1111/j.1365-294X.1997.tb00141.x

Taberlet P., Waits L. P., Luikart G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.* 1999. Vol. 14, no. 8. P. 323–327. doi: 10.1016/j.jtvc.2018.08.053

Wasser S. K., Houston C. S., Koehler G. M., Cadd G. G., Fain S. R. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Mol. Ecol.* 1997. Vol. 6. P. 1091–1097. doi: 10.1046/j.1365-294X.1997.00281.x

Received March 26, 2019

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кузнецова Анастасия Сергеевна

аспирант, стажер-исследователь
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: kuznecova_nastya@inbox.ru
тел.: (8142) 573140

Тирронен Константин Феликсович

заведующий лаб. зоологии, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: kostja.t@mail.ru
тел.: (8142) 573140

CONTRIBUTORS:

Kuznetsova, Anastasiia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: kuznecova_nastya@inbox.ru
tel.: (8142) 573140

Tirronen, Konstantin

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: kostja.t@mail.ru
tel.: (8142) 573140

Панченко Данила Владимирович

старший научный сотрудник лаборатории зоологии, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: danja@inbox.ru
тел.: (8142) 573140

Шрегель Джулия

PhD
Норвежский Институт Биоэкономических исследований
NO-9925 Сванвик, Норвегия
эл. почта: julia.schregel@nibio.no

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

Panchenko, Danila

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: danja@inbox.ru
tel.: (8142) 573140

Schregel, Julia

Norwegian Institute for Bioeconomy, Svanhovd
NO-9925 Svanvik, Norway
e-mail: julia.schregel@nibio.no

Khizhkin, Evgeny

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

Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: hizhkin84@mail.ru
tel.: (8142) 573107

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 591.111.1:599.32

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ОТРЯДА RODENTIA

**А. Г. Кижина, С. Н. Сергина, Л. Б. Узенбаева, В. А. Илюха,
Э. Ф. Печорина, Е. П. Антонова, А. Е. Якимова, Д. В. Панченко**

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

Эритроциты играют ведущую роль в газотранспортной функции крови и обеспечении тканей кислородом, причем определяющее значение в этом процессе имеют количество и размеры красных клеток крови. Параметры эритроцитов у различных видов значительно варьируют и зависят от ряда условий. Данные по влиянию различных факторов (условия существования, образ жизни, филогенетическое положение, масса тела) на размеры эритроцитов противоречивы. Выбор млекопитающих отряда Rodentia был продиктован чрезвычайно обширной зоной их расселения и экологическими особенностями. Сравнительное исследование морфометрических показателей (площади поверхности и диаметра) красных клеток крови было выполнено у 11 видов млекопитающих отряда Rodentia: европейского (*Castor fiber*), канадского (*C. canadensis*) бобров, нутрии (*Myocastor coypus*), ондатры (*Ondatra zibethicus*), крысы (*Rattus norvegicus*), шиншиллы (*Chinchilla lanigera*), обыкновенной белки (*Sciurus vulgaris*), рыжей (*Myodes glareolus*), водяной (*Arvicola amphibius*) полевки, лабораторной мыши (*Mus musculus*) и сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*). Установлена прямая зависимость размера эритроцитов от массы тела, что согласуется с данными других исследователей. Максимальный размер эритроцитов был отмечен у *C. canadensis* и *C. fiber*. Помимо этого, крупные эритроциты выявлены у всех представителей группы полуводных животных. Площадь эритроцитов у наземных видов грызунов снижалась в ряду *C. lanigera* – *R. norvegicus* – *M. auratus* – *S. vulgaris* – *M. musculus* – *M. glareolus*. Показано влияние физиологических (вес, пол, продолжительность жизни) и экологических (характер питания и среды) факторов на морфометрические параметры эритроцитов, при этом систематическая принадлежность не оказала влияния на размеры клеток.

Ключевые слова: эритроциты; диаметр; площадь поверхности; грызуны; метаболизм; среда обитания.

A. G. Kizhina, S. N. Sergina, L. B. Uzenbaeva, V. A. Ilyukha, E. F. Pechorina, E. P. Antonova, A. E. Yakimova, D. V. Panchenko. MORPHOMETRIC PARAMETERS OF ERYTHROCYTES IN SEVERAL RODENTIA SPECIES

Red blood cells (RBC) play a leading role in the blood gas transport function and oxygen supply to tissues, and the number and size of RBC have a decisive role in tissue

oxygenation. The size of erythrocyte varies significantly among animal species, depending on a number of factors. Data on the effect of various factors (living conditions, lifestyle, systematic affiliation, body weight) on the size of RBC are contradictory. The choice of mammals belonging to the Rodentia order was dictated by their very extensive distribution range and ecological features. A comparative study of the morphometric parameters (surface area and diameter) of RBC was performed for 11 Rodentia species: European beaver (*Castor fiber*), Canadian beaver (*C. canadensis*), nutria (*Myocastor coypus*), muskrat (*Ondatra zibethicus*), rat (*Rattus norvegicus*), chinchilla (*Chinchilla lanigera*), red squirrel (*Sciurus vulgaris*), bank vole (*Myodes glareolus*), European water vole (*Arvicola amphibius*), laboratory mouse (*Mus musculus*) and Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). A direct dependence of the size of erythrocytes on body weight was established, which agrees with the data reported by other researchers. The maximum size of RBC was noted in *C. canadensis* and *C. fiber*. Besides, large erythrocytes were detected in all the studied semiaquatic animals. The surface area of erythrocytes in terrestrial rodent species decreased in the following order: *C. lanigera* – *R. norvegicus* – *S. vulgaris* – *M. musculus* – *M. glareolus*. The influence of physiological (weight, sex, longevity) and ecological factors (food habits and habitat) on the morphometric parameters of erythrocytes was revealed, while systematic affiliation did not affect cell size.

Key words: erythrocytes; diameter; surface area; rodents; metabolism; environment.

Введение

Морфометрические параметры (количество, размер, площадь поверхности и др.), характеризующие интенсивность газообмена между внешней средой и тканями организма, являются важными физиологическими показателями эритроцитов [Галанцев, 1977]. Способность переносить кислород у всех позвоночных определяется содержанием дыхательного пигмента гемоглобина в клетке, а его количество, в свою очередь, зависит от объема и площади поверхности эритроцита [Kostelecka-Myrcha, 1973].

В настоящее время эритроцит рассматривают не только как специализированный газотранспортный контейнер, но и как элемент, принимающий участие в окислительно-восстановительных реакциях, транспорте глюкозы, клеточной пролиферации, а также в иммунном ответе [Tsantes et al., 2006; Montel-Hagen et al., 2009; Perez-Gordones et al., 2009; Morera, MacKenzie, 2011]. Показатели красной крови являются достаточно чувствительным индикатором состояния организма и изменяются под действием различных условий – радиации, теплового режима, гипоксии, нарушений тканевого обмена [Жеребин, Чухловин, 1989; Материй и др., 2003].

Для различных видов млекопитающих выявлены общие закономерности, характеризующие соотношение размеров и содержания эритроцитов в периферической крови. На примере многих видов продемонстрирована прямая зависимость размера эритроцитов от массы тела и обратная – от общего содержания эритроцитов крови [Kostelecka-Myrcha, 2002]. Од-

нако это утверждение не следует считать абсолютным, поскольку близкими по величине эритроцитами обладают различающиеся по массе тела животные – горбатый кит (*Megaptera novaeangliae* (Borowski, 1781), Cetacea) весом в 30 тонн и представители землеройковых (Soricidae, Insectivora) с массой тела в несколько граммов [Schmidt-Nielsen, 1984]. Эритроциты сравнительно небольшого диаметра выявлены у довольно крупных млекопитающих, представителей парнокопытных (Artiodactyla) – кабарги (*Moschus moschiferus* (L., 1758)) с массой тела до 18 кг, домашней козы (*Capra hircus* (L., 1758)) весом 35–40 кг и 60-килограммового кубанского тура (*Capra caucasica* (Güldenstaedt and Pallas, 1783)) [Gulliver, 1875; Ponder, 1948]. В то же время у не превышающей 80 г равнинной вискачевой крысы (*Tympanoctomys barrerae* (Lawrence, 1941), Rodentia) размеры эритроцитов примерно в два раза больше [Gregory, 2001]. На сегодняшний день противоречия, касающиеся аллометрических зависимостей, остаются нерешенными.

Показано, что с увеличением количества эритроцитов возрастают кислородные запасы и вязкость крови, и это неизбежно замедляет ее циркуляцию [Promislow, 1991]. У видов с крупными эритроцитами наблюдается небольшой диапазон колебаний их количества. Обратная зависимость также установлена между содержанием эритроцитов и массой тела. Однако, несмотря на то что у представителей отрядов хищных (Carnivora) и грызунов (Rodentia) эти два показателя отрицательно коррелируют друг с другом, их средние значения у плотоядных животных выше, чем у грызунов.

Таблица 1. Диаметр эритроцитов крови ($M \pm m$) у исследованных видов отряда Rodentia

Table 1. Erythrocyte diameter ($M \pm m$) in the studied Rodentia species

Семейство / подсемейство Family / subfamily	Вид Species	Пол, n Sex, n	Диаметр эритроцитов, мкм Erythrocyte diameter, μm
Cricetidae, Arvicolinae	<i>Myodes glareolus</i>	♂ (n=1)	5,52 ± 0,01
Muridae, Murinae	<i>Mus musculus</i>	♀ (n=3)	6,30 ± 0,01
		♂ (n=6)	6,19 ± 0,01*
Sciuridae	<i>Sciurus vulgaris</i>	♀ (n=2)	6,55 ± 0,01
		♂ (n=2)	6,34 ± 0,01*
Cricetidae, Cricetinae	<i>Mesocricetus auratus</i>	♀ (n=4)	6,58 ± 0,01
Cricetidae, Arvicolinae	<i>Arvicola amphibius</i>	♀ (n=1)	6,57 ± 0,02
		♂ (n=2)	6,43 ± 0,01*
Chinchillidae	<i>Chinchilla lanigera</i>	♀ (n=12)	6,71 ± 0,01
Muridae, Murinae	<i>Rattus norvegicus</i>	♀ (n=8)	6,52 ± 0,01
		♂ (n=9)	6,63 ± 0,01*
Cricetidae, Arvicolinae	<i>Ondatra zibethicus</i>	♀ (n=3)	7,13 ± 0,01
		♂ (n=7)	7,17 ± 0,01*
Myocastoridae	<i>Myocastor coypus</i>	♀ (n=7)	7,76 ± 0,01
		♂ (n=5)	7,99 ± 0,01*
Castoridae	<i>Castor fiber</i>	♀ (n=1)	8,04 ± 0,03
		♂ (n=1)	8,40 ± 0,03*
	<i>C. canadensis</i>	♀ (n=1)	8,14 ± 0,03
		♂ (n=2)	8,64 ± 0,03*

Примечание. *Различия достоверны по сравнению с самцами, $p < 0,01$, t-критерий Стьюдента.

Note. *Significant difference in comparison with males of the same species, $p < 0.01$ (Student's t test).

Это указывает на существование третьей переменной, которая может объяснить изменения, не связанные с массой тела [Promislow, 1991].

Неоднозначными представляются сведения, касающиеся влияния экологических факторов на состав и размеры клеток крови. Б. К. МакНаб [MacNab, 1986, 2008] установил взаимосвязь между уровнем метаболизма и характером питания, однако убедительные доказательства их корреляции с гематологическими показателями отсутствуют. Это подтверждается близкими значениями размеров эритроцитов, обнаруженных у зайцеобразных (Lagomorpha) и хищных (Carnivora), и, напротив, значительными различиями между представителями отрядов парнокопытных (Artiodactyla) и приматов (Primates), многие из которых являются травоядными [Promislow, 1991]. Вероятно, значительное влияние могут оказывать образ жизни и условия существования. К. Шмидт-Ниельсен [Schmidt-Nielsen, 1984] объяснял относительно высокие значения объема эритроцитов у ластоногих (Pinnipedia) адаптацией к гипоксии во время длительного погружения. В то же время объем эритроцитов у дельфинов (Delphinidae (Gray, 1821)) не отличается существенно от такового у человека, собаки (*Canis lupus familiaris* (L., 1758), Canidae) и шакала (*Canis aureus* (L., 1758), Canidae) [Галанцев, 1977].

Целью данной работы являлось определение морфометрических параметров эритроцитов у 11 видов млекопитающих отряда Rodentia, обитающих в различных экологических условиях.

Материалы и методы

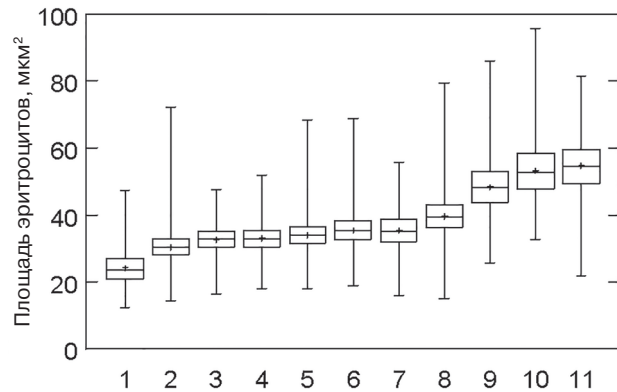
Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» с соблюдением Международных принципов Директивы Евросоюза 2010/63/EU о гуманном отношении к животным и Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных [Этическая..., 2005].

Исследование морфометрических параметров эритроцитов периферической крови было проведено у 11 видов отряда Rodentia: европейского (*Castor fiber*), канадского (*C. canadensis*) бобров, нутрии (*Myocastor coypus*), ондатры (*Ondatra zibethicus*), крысы (*Rattus norvegicus*), шиншиллы (*Chinchilla lanigera*), обыкновенной белки (*Sciurus vulgaris*), рыжей (*Myodes glareolus*), водяной (*Arvicola amphibius*) полевки, лабораторной мыши (*Mus musculus*) и сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*); их видовой и количественный, а также половой

состав представлен в таблице 1. Свежеприготовленные и окрашенные по Паппенгейму мазки крови исследовали в световом микроскопе (Axioscop 40, Carl Zeiss, Германия) с цветной цифровой видеокамерой (Pixera 150ES). Производили микроскопическую съемку 10 полей зрения каждого препарата и в дальнейшем измеряли площадь поверхности и диаметр эритроцитов с применением методики NCR (nuclear-cytoplasmic ratio), входящей в пакет программного обеспечения «ВидеоТест 4.0». Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами [Ивантер, Коросов, 2010]. Достоверность различий между самками и самцами анализировали с помощью t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$). Производили оценку влияния различных факторов (пол, вес, продолжительность жизни, уровень метаболизма, систематическая принадлежность, характер питания и места обитания) на морфометрические параметры эритроцитов (MANOVA). Влияние фактора считалось достоверно значимым при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Представители отряда Rodentia, самого многочисленного среди млекопитающих, имеют чрезвычайно обширную зону распространения от Арктики до пустынь, занимая всевозможные биотопы [Пантелеев, 2010]. У изученных видов наблюдались значительные различия морфометрических параметров эритроцитов крови (рис. 1, табл. 1). Наименьшая величина диаметра эритроцитов характерна для *M. glareolus*, мелкого грызуна, масса которого не превышает 20 г. Близкие к этому виду значения диаметра имели лабораторные мыши *M. musculus*. Эритроциты с наибольшим диаметром отмечены у крупных полуводных животных *M. coypus*, *C. fiber* и *C. canadensis*, причем их максимальная величина наблюдалась у самцов *C. canadensis*. Промежуточное положение занимали виды *S. vulgaris*, *M. auratus*, *A. amphibius*, *C. lanigera*, *R. norvegicus*. При определении площади эритроцитов установлено аналогичное распределение видов. Наименьшая площадь выявлена у *M. glareolus*, тогда как наиболее высокие средние значения установлены у *M. coypus*, *C. fiber* и *C. canadensis*. Эти три вида ныряльщиков характеризовались также более широкими пределами колебаний и интерквартильным размахом по сравнению с остальными видами (рис.). Близкие средние значения площади эритроцитов имели представители разных семейств – *S. vulgaris*, *M. auratus*, *A. amphibius*, *C. lanigera*, *R. norvegicus*.



Площадь поверхности эритроцитов у различных видов отряда Rodentia:

1 – *Myodes glareolus*, 2 – *Mus musculus*, 3 – *Sciurus vulgaris*, 4 – *Mesocricetus auratus*, 5 – *Arvicola amphibius*, 6 – *Chinchilla lanigera*, 7 – *Rattus norvegicus*, 8 – *Ondatra zibethicus*, 9 – *Myocastor coypus*, 10 – *Castor fiber*, 11 – *C. canadensis*. + – средние значения (M), горизонтальная черта – медиана, вертикальная черта – пределы колебаний, □ – 1 и 3 квартили

Surface area of erythrocytes in the studied Rodentia species:

1 – *Myodes glareolus*, 2 – *Mus musculus*, 3 – *Sciurus vulgaris*, 4 – *Mesocricetus auratus*, 5 – *Arvicola amphibius*, 6 – *Chinchilla lanigera*, 7 – *Rattus norvegicus*, 8 – *Ondatra zibethicus*, 9 – *Myocastor coypus*, 10 – *Castor fiber*, 11 – *C. canadensis*. + – mean values (M), the horizontal line is the median, the vertical line is the range of oscillations, □ – 1 and 3 quartiles

Выявлены достоверные половые различия в размерах эритроцитов, причем у полуводных животных более крупные эритроциты характерны преимущественно для самцов, а среди наземных – для самок (табл. 1). Эти различия не связаны, по всей видимости, с разницей в массе тела у самок и самцов, поскольку подобную зависимость проследить не удалось. Данные литературы по влиянию пола на размеры эритроцитов у млекопитающих противоречивы. Одни исследователи указывают на их отсутствие [Sealand, 1965], тогда как другие отмечают более крупные клетки у самок по сравнению с самцами [Miller et al., 1961].

Факторы различной природы могут оказывать влияние на размер эритроцитов у позвоночных [Snyder, Sheafor, 1999; Starostova et al., 2009]. Одни из самых крупных эритроцитов характерны для эволюционно более древних позвоночных – хвостатых амфибий, в дальнейшем, по мере совершенствования дыхательной функции крови объем эритроцита уменьшается [Hawkey et al., 1991]. Существуют предположения, что в ходе эволюции, направленной в том числе на усиление эффективности функционирования сердечно-сосудистой системы, кровяное давление возрастало за счет снижения диаметра сосудов в ряду амфибии – птицы – млеко-

Таблица 2. Эколого-физиологические характеристики исследованных видов отряда Rodentia

Table 2. Ecological and physiological features of the studied Rodentia species

Вид Species	Масса тела, кг Body mass, kg	Уровень метаболизма, (VO ₂ max (мл/мин))* Metabolic rate, (VO ₂ max (ml/min))*	Продолжи- тельность жизни, лет** Longevity, years**	Пищевые предпочте- ния*** Food habits***	Условия обитания в природе*** Habitat***	Образ жизни*** Lifestyle***	Место обитания / содержания Nature
<i>Castor fiber</i>	17,50	-	13,7	ЛК LR	ПВ FW	ПВ SA	ДП W
<i>C. canadensis</i>	19,87	4688	23,4	ЛК LR	ПВ FW	ПВ SA	ДП W
<i>Myocastor coypus</i>	5,00	3027,4	8,5	Т G	УВ M	ПВ SA	СН СВ
<i>Myodes glareolus</i>	0,02	55,7	4,9	С S	УВ M	Н Т	ДП W
<i>Arvicola amphibius</i>	0,08	113,1	2,5	Т G	УВ M	Н Т	ДП W
<i>Ondatra zibethicus</i>	0,93	690,4	5,8	ЛК LR	УВ M	ПВ SA	ДП W
<i>Mesocricetus auratus</i>	0,13	111,5	3,9	В O	З X	Н Т	СН СВ
<i>Chinchilla lanigera</i>	0,63	279,3	17,2	Т G	П D	Н Т	СН СВ
<i>Sciurus vulgaris</i>	0,35	-	14,8	С S	УВ M	ДЛ WC	ДП W
<i>Rattus norvegicus</i>	0,34	231,5	3,8	В O	УВ M	Н Т	СН СВ
<i>Mus musculus</i>	0,02	-	4,0	С S	УВ M	Н Т	СН СВ

Примечание. Пищевые предпочтения: ЛК – листья, корни, Т – трава, С – семена, В – всеядность. Условия обитания в природе: ПВ – пресный водоем, УВ – местность с умеренной влажностью, П – пустыня, З – засушливая местность. Образ жизни: ПВ – полуводный, Н – наземный, ДЛ – древесно-лазающий. Место обитания/содержания: ДП – дикая природа, СН – содержание в неволе. * По: Genoud et al., 2018; ** по: McNab, 2008; *** по материалам genomics.senescence.info.

Notes. Food habits: LR – leaves, roots, G – grass, S – seed, O – omnivorous. Habitat: FW – freshwater, M – mesic, D – desert, X – xeric. Lifestyle: SA – semiaquatic, T – terrestrial, WC – wood-climbing. Nature: W – wild, CB – captive breeding. * According to Genoud et al., 2018; ** according to McNab, 2008; *** according to genomics.senescence.info.

питающие, что повлекло за собой уменьшение размера эритроцитов [Snyder, Sheafor, 1999]. Тесная корреляция между размером генома, уровнем метаболизма и величиной эритроцитов прослеживается на различных таксономических уровнях – от вида до отряда [Gregory, 2000]. Одним из примеров, подтверждающих данную зависимость, являются грызуны рода щетинистых крыс (*Proechimys*), которые имеют самые большие гаплоидные геномы среди млекопитающих, ведут достаточно «вялый» образ жизни и, по всей видимости, должны иметь крупные эритроциты [Garagna et al., 1997; Gregory, 2000]. Известно, что продолжительность жизни эритроцитов напрямую коррелирует со скоростью метаболизма животных: чем выше его уровень, тем короче клеточный цикл [Harvey, 1997]. Также показана положительная корреляция уровня метаболизма с содержанием ретикулоцитов – предшественников зрелых форм эритроцитов [Promislow, 1991].

Исследованные нами виды значительно различаются по массе тела, уровню метаболизма,

характеру питания и местообитания (табл. 2). Проведенный многофакторный анализ позволил установить влияние физиологических (вес, пол, продолжительность жизни, уровень метаболизма) и экологических факторов (характера питания и среды) на морфометрические параметры эритроцитов. Наиболее сильное влияние на площадь эритроцитов оказывают особенности местообитания животных, а минимальное – пол, при этом систематическая принадлежность не оказала значимого эффекта. Нами выявлено, что у *A. amphibius* – полуводного вида – средняя площадь эритроцитов выше ($33,09 \pm 0,09$ мкм²), чем у родственной ей наземной *M. glareolus* ($24,23 \pm 0,16$ мкм²). Ранее сообщалось, что при близких показателях гемоглобина и гематокрита у равнинной *M. glareolus* и предпочитающей горные районы снеговой полевки (*Chionomys nivalis* (Martins, 1842)) наблюдаются значительные различия в количестве и размере эритроцитов [Kostelecka-Murccha, 1973]. Горные и предгорные популяции *A. amphibius* различались по содержанию гемо-

глубина крови и относительным размерам селезенки [Барагунова и др., 2017].

Большие размеры эритроцитов выявлены у всех полуводных животных, особенно у крупных ныряльщиков – *M. coypus*, *C. fiber* и *C. canadensis*. С. Гирлинг и соавт. [Girling et al., 2015] показали, что объем эритроцитов бобров почти вдвое превышает объем красных клеток наземных животных. Для млекопитающих, способных задерживать дыхание при нырянии, площадь эритроцитов, наряду с уровнем гемоглобина и кислородной емкостью крови, является существенной физиологической характеристикой. Важнейшее значение в развитии адаптивных способностей ныряющих животных также имеют свойственные им высокие запасы миоглобина, полная утилизация кислорода при снижении его потребления под водой, особенности регуляции дыхания и кровообращения [Галанцев, 1977].

Среди видов, требовательных к запасам кислорода, помимо ныряльщиков можно особо выделить шиншиллу *C. lanigera*, в природе обитающих в условиях высокогорья, и сирийских хомячков *M. auratus*, ведущих норный образ жизни. По нашим данным, размер эритроцитов у *C. lanigera* был сравним с этим показателем у *M. auratus*, а также у *A. amphibius* и *R. norvegicus*, несмотря на то, что экологические условия этих видов различаются. По другим сведениям, *C. lanigera* обладает значительным объемом эритроцитов ($101,3 \text{ мкм}^3$) при их общем относительно невысоком содержании ($3,8 \times 10^{12}/\text{л}$) [Silva et al., 2005].

Нами продемонстрирована значительная зависимость параметров эритроцитов от массы тела: крупные клетки имели самые большие из исследованных грызунов – *C. fiber* и *C. canadensis*, тогда как мелкие эритроциты характерны для животных с низким весом – *M. glareolus*, *M. musculus*. Объем эритроцитов у капибары (*Hydrochoerus hydrochaeris* (L., 1766), Rodentia) – крупного ныряльщика – в среднем составлял 132 мкм^3 , что на 32 % выше значений у *C. fiber* и *C. canadensis* [Chiacchio et al., 2014; Girling et al., 2015]. Диаметр эритроцитов хохлатого дикобраза (*Hystrix cristata cristata* (L., 1758), Rodentia), третьего по величине среди грызунов после капибары и бобров, составляет $7,5 \text{ мкм}$ [Hawkey, 1975], что хотя и превышает большинство полученных нами значений у Rodentia, но уступает параметрам *M. coypus*. Д. Промислов [Promislow, 1991], анализируя связь различных параметров крови от массы тела, пришел к выводу, что ее влияние заметно в тех случаях, когда речь идет об отряде или более низких таксонах. Крупные млекопитающие, как правило, демонстрируют тенденцию к невысоким значе-

ниям содержания эритроцитов, ретикулоцитов и имеют клетки относительно большого объема.

Заключение

Показана значительная вариабельность диаметра и площади поверхности эритроцитов среди изученных видов млекопитающих отряда Rodentia. В ходе исследования удалось подтвердить прямую зависимость размеров эритроцитов от массы тела и установить корреляции с уровнем метаболизма, а также с половой принадлежностью. Согласно нашим данным, экологические факторы, такие как особенности местообитания и образ жизни животных, в значительной степени влияют на морфометрические параметры эритроцитов.

Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0073, 0218-2019-0080).

Авторы выражают глубокую признательность к б. н. Е. А. Хижкину за помощь в подготовке иллюстративного материала, а также анонимным рецензентам за ценные замечания.

Литература

- Барагунова Е. А., Лампежева Р. М., Сабанова Р. К., Тхабисимова М. М., Абазокова Ф. Б., Хуранова Е. Р. Сравнительная характеристика гематологических и морфофизиологических показателей водяной полевки (*Arvicola terrestris rufescens* Sat.) горной и предгорной популяции Центрального Кавказа // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 3. С. 148.
- Галанцев В. П. Эволюция адаптаций ныряющих животных. Л.: Наука, 1977. 191 с.
- Жеребин Е. А., Чухловин А. Б. Радиационная гематология. М.: Медицина, 1989. 176 с.
- Ивантер Э. В., Коросов А. В. Элементарная биометрия: учеб. пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, 2010. 104 с.
- Материй Л. Д., Ермакова О. В., Таскаев А. И. Морфофункциональная оценка состояния организма мелких млекопитающих в радиоэкологических исследованиях (на примере полевки-экономки). Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 2003. 164 с.
- Пантелеев П. А. Родентология. М.: КМК, 2010. 221 с.
- Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации / Ред. Ю. Б. Белоусова. М.: Изд-во об-ва клин. исслед., 2005. 156 с.
- Chiacchio R. G., Prioste F. E., Vanstreels R. E., Knobl T., Kolber M., Miyashiro S. I., Matushima E. R. Health evaluation and survey of zoonotic pathogens in free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*)

ris) // J. Wildl. Dis. 2014. Vol. 50, no. 3. P. 496–504. doi: 10.7589/2013-05-109

Garagna S., Perez-Zapata A., Zuccotti M., Mascherretti S., Marziliano N., Redi C. A., Aguilera M., Capanna E. Genome composition in Venezuelan spiny-rats of the genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae). I. Genome size, C-heterochromatin and repetitive DNAs in situ hybridization patterns // Cytogenet. Cell Genet. 1997. Vol. 78, no. 1. P. 36–43. doi: 10.1159/000134622.

Genoud M., Isler K., Martin R. D. Comparative analyses of basal rate of metabolism in mammals: data selection does matter // Biol. Rev. 2018. Vol. 93, no. 1. P. 404–438. doi: 10.1111/brv.12350

Girling S. J., Campbell-Palmer R., Pizzi R., Fraser M. A., Cracknell J., Arnemo J., Rosell F. Haematology and serum biochemistry parameters and variations in the Eurasian Beaver (*Castor fiber*) // PLoS ONE. 2015. Vol. 10, no. 6. P. e0128775. doi: 10.1371/journal.pone.0128775

Gregory T. R. Nucleotypic effects without nuclei: Genome size and erythrocyte size in mammals // Genome. 2000. Vol. 43, no. 5. P. 895–901.

Gregory T. R. The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates // Blood Cells Mol. Dis. 2001. Vol. 27, no. 5. P. 830–843. doi: 10.1006/bcmd.2001.0457

Gulliver G. Observations on the sizes and shapes of the red corpuscles of the blood of vertebrates, with drawings of them to a uniform scale, and extended and revised tables of measurements // Proc. Zool. Soc. London. 1875. P. 474–495.

Harvey J. W. The erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders // Clinical Biochemistry of Domestic Animals / Eds. J. J. Kaneko, J. W. Harvey, K. L. Bruss. Vol. 5. New York: Academic Press, 1997. P. 157–203. doi: 10.1016/B978-012396305-5/50008-7

Hawkey C. M., Bennetts M., Gascoyne C., Hart M. G., Kirkwood J. K. Erythrocyte size, number and haemoglobin content in vertebrates // Br. J. Haematol. 1991. Vol. 77, no. 3. P. 392–397.

Hawkey C. M. Comparative mammalian haematology. London: William Heinemann Medical Books Ltd., 1975. 174 p.

Kostelecka-Myrcha A. Regularities of variations of the haematological values characterizing the respiratory function of blood in mammals // Acta Theriol. 1973. Vol. 18, no. 1. P. 1–56. doi: 10.4098/AT.arch.73-1

Kostelecka-Myrcha A. The ratio of amount of haemoglobin to total surface area of erythrocytes in mammals // Acta Theriol. 2002. Vol. 47, no. 1. P. 209–220. doi: 10.1007/bf03192488

McNab B. K. An analysis of the factors that influence the level and scaling of mammalian BMR // Comp. Biochem. Physiol. Part A. 2008. Vol. 151, no. 1. P. 5–28. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.05.008

McNab B. K. The influence of food habits on the energetics of eutherian mammals // Ecol. Monogr. 1986. Vol. 56, no. 1. P. 1–19. doi: 10.2307/2937268

Miller E. R., Ullrey D. E., Ackermann I., Schmidt D. A., Luecke R. W., Hoefler J. A. Swine hematology from birth to maturity. II. Erythrocyte population, size and hemoglobin concentration // J. Anim. Sci. 1961. Vol. 20, no. 4. P. 890–897. doi: 10.2527/jas1961.204890x

Montel-Hagen A., Sitbon M., Taylor N. Erythroid glucose transporters // Curr. Opin. Hematol. 2009. Vol. 16, no. 3. P. 165–172. doi: 10.1097/MOH.0b013e328329905c

Morera D., MacKenzie S. A. Is there a direct role for erythrocytes in the immune response? // Vet. Res. 2011. Vol. 42, no. 89. P. 1–8. doi: 10.1186/1297-9716-42-89

Perez-Gordones M. C., Lugo M. R., Winkler M., Cervino V., Benaim G. Diacylglycerol regulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes by direct interaction // Arch. Biochem. Biophys. 2009. Vol. 489, no. 1–2. P. 55–61. doi: 10.1016/j.abb.2009.07.010

Ponder E. Hemolysis and related phenomena. New York: Grune and Stratton Inc., 1948. 57 p.

Promislow D. E. L. The evolution of mammalian blood parameters: Patterns and their interpretation // Physiol. Zool. 1991. Vol. 64, no. 2. P. 393–431.

Schmidt-Nielsen K. Scaling: why is animal size so important? Cambridge University Press: Cambridge, 1984. 241 p.

Sealand J. A. The influence of body size, season, sex, age and other factors upon some blood parameters in small mammals // J. Mammal. 1965. Vol. 45, no. 4. P. 598–616. doi: 10.2307/1377331

Silva T. de O., Kreutz L. C., Barcellos L. J. G., Borella J., Soso A. B., Souza C. Reference values for chinchilla (*Chinchilla laniger*) blood cells and serum biochemical parameters // Ciência Rural. 2005. Vol. 35, no. 3. P. 602–606. doi: 10.1590/s0103-84782005000300017

Snyder G. K., Sheafor B. A. Red blood cells: centerpiece in the evolution of the vertebrate circulatory system // Amer. Zool. 1999. Vol. 39. P. 189–198. doi: 10.1093/icb/39.2.189

Starostová Z., Kubička L., Konarzewski M., Kozłowski J., Kratochvíl L. Cell size but not genome size affects scaling of metabolic rate in Eyelid geckos // Am. Nat. 2009. Vol. 174, no. 3. P. E100–E105. doi: 10.1086/603610

Tsantes A. E., Bonovas S., Travlou A., Sitaras N. M. Redox imbalance, macrocytosis, and RBC homeostasis // Antioxid. Redox. Signal. 2006. Vol. 8. P. 1205–1216.

The animal ageing and longevity database. URL: <http://www.genomics.senescence.info/> (дата обращения 06.11.2018).

Поступила в редакцию 07.11.2018

References

Baragunova E. A., Lampezheva R. M., Sabanova R. K., Thabisimova M. M., Abazokova F. B., Khuranova E. R. Sravnitel'naya kharakteristika gematologicheskikh i morfofiziologicheskikh pokazatelei vodyanoi plevki (*Arvicola terrestris rufescens* Sat.) gornoi

i predgornoi populyatsii tsentral'nogo Kavkaza [Comparative characteristics of hematological and morphophysiological indicators of the water vole (*Arvicola terrestris rufescens* Sat.) of the mountain and land population of the central Caucasus]. *Sovr. probl. nauki*

i obraz. [Modern Probl. of Sci. and Ed.]. 2017. No. 3. 148 p.

Eticheskaya ekspertiza biomeditsinskikh issledovaniy. Prakticheskie rekomendatsii [Ethical examination of biomedical research. Practical guidelines]. Ed. Yu. B. Belousova. Moscow, 2005. 156 p.

Galantsev V. P. Evolyutsiya adaptatsii nryayushchikh zhivotnykh [The evolution of adaptations of diving animals]. Leningrad: Nauka, 1977. 191 p.

Ivanter E. V., Korosov A. V. Elementarnaya biometriya: uchebnoe posobie [Elementary biometrics: a textbook]. Petrozavodsk: PetrGU, 2010. 104 p.

Materii L. D., Ermakova O. V., Taskaev A. I. Morfofunktsional'naya otsenka sostoyaniya organizma melkikh mlekopitayushchikh v radioekologicheskikh issledovaniyakh (na primere polevki-ekonomki) [Morphofunctional assessment of the state of the organism of small mammals in radioecological studies (for example, vole housekeeper)]. Syktyvkar: Komi NTs UrO RAN, 2003. 164 p.

Panteleev P. A. Rodentologiya [Rodentology]. Moscow: KMK, 2010. 221 p.

Zherebin E. A., Chukhlovin A. B. Radiatsionnaya gematologiya [Radiation hematology]. Moscow: Meditsina, 1989. 176 p.

Chiacchio R. G., Prioste F. E., Vanstreels R. E., Knobl T., Kolber M., Miyashiro S. I., Matushima E. R. Health evaluation and survey of zoonotic pathogens in free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *J. Wildl. Dis.* 2014. Vol. 50, no. 3. P. 496–504. doi: 10.7589/2013-05-109

Garagna S., Perez-Zapata A., Zuccotti M., Maschertti S., Marziliano N., Redi C. A., Aguilera M., Capanna E. Genome composition in Venezuelan spiny-rats of the genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae). I. Genome size, C-heterochromatin and repetitive DNAs in situ hybridization patterns. *Cytogenet. Cell Genet.* 1997. Vol. 78, no. 1. P. 36–43. doi: 10.1159/000134622

Genoud M., Isler K., Martin R. D. Comparative analyses of basal rate of metabolism in mammals: data selection does matter. *Biol. Rev.* 2018. Vol. 93, no. 1. P. 404–438. doi: 10.1111/brv.12350

Girling S. J., Campbell-Palmer R., Pizzi R., Fraser M. A., Cracknell J., Arnemo J., Rosell F. Haematology and serum biochemistry parameters and variations in the Eurasian Beaver (*Castor fiber*). *PLoS ONE.* 2015. Vol. 10, no. 6. P. e0128775. doi: 10.1371/journal.pone.0128775

Gregory T. R. Nucleotypic effects without nuclei: Genome size and erythrocyte size in mammals. *Genome.* 2000. Vol. 43, no. 5. P. 895–901.

Gregory T. R. The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates. *Blood Cells Mol. Dis.* 2001. Vol. 27, no. 5. P. 830–843. doi: 10.1006/bcmd.2001.0457

Gulliver G. Observations on the sizes and shapes of the red corpuscles of the blood of vertebrates, with drawings of them to a uniform scale, and extended and revised tables of measurements. *Proc. Zool. Soc. London.* 1875. P. 474–495.

Harvey J. W. The erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Eds. J. J. Kaneko, J. W. Har-

vey, K. L. Bruss. N.Y.: Academic Press, 1997. Vol. 5. P. 157–203. doi: 10.1016/B978-012396305-5/50008-7

Hawkey C. M., Bennetts M., Gascoyne C., Hart M. G., Kirkwood J. K. Erythrocyte size, number and haemoglobin content in vertebrates. *Br. J. Haematol.* 1991. Vol. 77, no. 3. P. 392–397.

Hawkey C. M. Comparative mammalian haematology. London: William Heinemann Medical Books Ltd., 1975. 174 p.

Kostelecka-Myrcha A. Regularities of variations of the haematological values characterizing the respiratory function of blood in mammals. *Acta Theriol.* 1973. Vol. 18, no. 1. P. 1–56. doi: 10.4098/AT.arch.73-1

Kostelecka-Myrcha A. The ratio of amount of haemoglobin to total surface area of erythrocytes in mammals. *Acta Theriol.* 2002. Vol. 47, no. 1. P. 209–220. doi: 10.1007/bf03192488

McNab B. K. An analysis of the factors that influence the level and scaling of mammalian BMR. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 2008. Vol. 151, no. 1. P. 5–28. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.05.008

McNab B. K. The influence of food habits on the energetics of eutherian mammals. *Ecol. Monogr.* 1986. Vol. 56, no. 1. P. 1–19. doi: 10.2307/2937268

Miller E. R., Ullrey D. E., Ackermann I., Schmidt D. A., Luecke R. W., Hoefler J. A. Swine hematology from birth to maturity. II. Erythrocyte population, size and hemoglobin concentration. *J. Anim. Sci.* 1961. Vol. 20, no. 4. P. 890–897. doi: 10.2527/jas1961.204890x

Montel-Hagen A., Sitbon M., Taylor N. Erythroid glucose transporters. *Curr. Opin. Hematol.* 2009. Vol. 16, no. 3. P. 165–172. doi: 10.1097/MOH.0b013e328329905c

Morera D., MacKenzie S. A. Is there a direct role for erythrocytes in the immune response? *Vet. Res.* 2011. Vol. 42, no. 89. P. 1–8. doi: 10.1186/1297-9716-42-89

Perez-Gordones M. C., Lugo M. R., Winkler M., Cervino V., Benaim G. Diacylglycerol regulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes by direct interaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 2009. Vol. 489, no. 1–2. P. 55–61. doi: 10.1016/j.abb.2009.07.010

Ponder E. Hemolysis and related phenomena. New York: Grune and Stratton Inc., 1948. 57 p.

Promislow D. E. L. The evolution of mammalian blood parameters: Patterns and their interpretation. *Physiol. Zool.* 1991. Vol. 64, no. 2. P. 393–431.

Schmidt-Nielsen K. Scaling: why is animal size so important? Cambridge University Press: Cambridge, 1984. 241 p.

Sealander J. A. The influence of body size, season, sex, age and other factors upon some blood parameters in small mammals. *J. Mammal.* 1965. Vol. 45, no. 4. P. 598–616. doi: 10.2307/1377331

Silva T. de O., Kreutz L. C., Barcellos L. J. G., Borella J., Soso A. B., Souza C. Reference values for chinchilla (*Chinchilla laniger*) blood cells and serum biochemical parameters. *Ciência Rural.* 2005. Vol. 35, no. 3. P. 602–606. doi: 10.1590/s0103-84782005000300017

Snyder G. K., Sheafor B. A. Red blood cells: centerpiece in the evolution of the vertebrate circulatory system. *Amer. Zool.* 1999. Vol. 39. P. 189–198. doi: 10.1093/icb/39.2.189

Starostová Z., Kubička L., Konarzewski M., Kozłowski J., Kratochvíl L. Cell size but not genome size affects scaling of metabolic rate in Eyelid geckos. *Am. Nat.* 2009. Vol. 174, no. 3. P. E100–E105. doi: 10.1086/603610

Tsantes A. E., Bonovas S., Travlou A., Sitaras N. M. Redox imbalance, macrocytosis, and RBC homeo-

stasis. *Antioxid. Redox. Signal.* 2006. Vol. 8. P. 1205–1216.

The animal ageing and longevity database. URL: <http://www.genomics.senescence.info/> (accessed: 06.11.2018).

Received November 07, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кижина Александра Геннадьевна

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: golubewa81@yandex.ru
тел.: (8142) 573107

Сергина Светлана Николаевна

заведующая лабораторией, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: cvetnick@yandex.ru
тел.: (8142) 573107

Узенбаева Людмила Борисовна

старший научный сотрудник,
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) 769810

Печорина Эльвира Филипповна

старший 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

Антонова Екатерина Петровна

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: antonova88ep@mail.ru
тел.: (8142) 573107

CONTRIBUTORS:

Kizhina, Aleksandra

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

Sergina, Svetlana

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

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) 769810

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

Antonova, Ekaterina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: antonova88ep@mail.ru
tel.: (8142) 573107

Якимова Алина Евгеньевна

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: angelina73@mail.ru
тел.: (8142) 573140

Панченко Данила Владимирович

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: danja@inbox.ru
тел.: (8142) 573140

Yakimova, Alina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: angelina73@mail.ru
tel.: (8142) 573140

Panchenko, Danila

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: danja@inbox.ru
tel.: (8142) 573140

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 отдельные выпуски 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 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 общеупотребительных.

БЛАГОДАРНОСТИ. В этой рубрике выражается признательность частным лицам, сотрудникам учреждений и фондам, оказавшим содействие в проведении исследований и подготовке статьи, а также указываются источники финансирования работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. Пристатейные ссылки и/или списки пристатейной литературы следует оформлять по ГОСТ Р 7.0.5-2008. Библиографическая ссылка. Общие требования и правила составления (http://www.bookchamber.ru/GOST_P_7.0.5.-2008). Список работ представляется в алфавитном порядке. Все ссылки даются на языке оригинала (названия на японском, китайском и других языках, использующих нелатинский шрифт, пишутся в русской транскрипции). Сначала приводится список работ на русском языке и на языках с близким алфавитом (украинский, болгарский и др.), а затем – работы на языках с латинским алфавитом. В списке литературы между инициалами ставится пробел.

ТРАНСЛИТЕРИРОВАННЫЙ СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (REFERENCES). Приводится отдельным списком, повторяя все позиции основного списка литературы. Описания русскоязычных работ указываются в латинской транслитерации, рядом в квадратных скобках помещается их перевод на английский язык. Выходные данные приводятся на английском языке (допускается транслитерация названия издательства). При наличии переводной версии источника можно указать 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

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН

² Институт 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 °С) 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 Dul'durga:

(а) – 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.

Transactions of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences

No. 6, 2019

“EXPERIMENTAL BIOLOGY”

TABLE OF CONTENTS

REVIEWS

S. P. Rozkov, A. S. Goryunov. PHASE PROPERTIES OF PROTEIN SOLUTIONS AND PROTEIN DENATURATION	5
--	---

ORIGINAL PAPERS

N. P. Chernobrovkina, I. V. Morozova, M. K. Ilyinova. THE COMPOSITION OF TOTAL LIPID FRACTIONS AND FATTY ACIDS IN BUDS OF BIRCH SPECIES DURING BUD BREAK	16
--	----

E. I. Kaivarainen, N. N. Nemova. Na ⁺ /K ⁺ -ATPase ACTIVITY IN VARIOUS ORGANS OF THE STERLET (<i>ACIPENSER RUTHENUS</i> L.) UNDER CHANGES IN ENVIRONMENTAL FACTORS.	27
---	----

M. Yu. Krupnova, T. S. Ivanova, N. N. Nemova. THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEASES IN THE ORGANS OF FEMALE THREESPIKE STICKLEBACK (<i>GASTEROSTEUS ACULEATUS LINNAEUS</i>) IN THE SPAWNING PERIOD	37
--	----

R. U. Vysotskaya, E. A. Buoy, D. L. Lajus. THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL ENZYMES IN ORGANS OF THREESPIKE STICKLEBACK FROM DIFFERENT HABITATS IN THE GULF OF KANDALAKSHA, WHITE SEA, DURING THE SPAWNING PERIOD	44
--	----

D. A. Efremov, A. E. Veselov, M. A. Ruch'ev, M. A. Skorobogatov, L. K. Fyodorova, A. I. Madudin. TRIALS OF "SHAYBA 400" INCUBATION NESTS FOR CHUM SALMON (<i>ONCORHYNCHUS KETA</i>) EGGS IN SMALL TRIBUTARIES TO THE MALKA RIVER (SAKHALIN ISLAND)	57
--	----

D. I. Petrukhina. ASSESSMENT OF THE POSSIBILITY OF AN INCREASE IN THE BIOMASS AND SYNTHESIS PRODUCTS OF <i>SPIRULINA</i> & <i>ARTHROSPIRA</i> (CYANOPHYTA) AFTER CRYOPRESERVATION.	74
---	----

N. A. Shutskiy, L. L. Shagrov, S. L. Kashutin, A. S. Aksenov, S. I. Malyavskaya. CHANGES IN THE COLLAGEN CONTENT IN THE DERMIS OF RATS AFTER LOCAL COLD INJURIES	85
--	----

A. V. Tolstikov, I. A. Chernov. VARIABILITY OF BIOGEOCHEMICAL PROCESSES IN THE WHITE SEA UNDER DIFFERENT CLIMATIC CONDITIONS: THE MODELING APPROACH	92
---	----

T. N. Ilyina, I. V. Baishnikova, E. A. Khizhkin. THE EFFECT OF CONSTANT DARKNESS, MELATONIN AND ITS ANTAGONIST LUZINDOLE ON RETINOL AND TOCOPHEROL IN RATS	103
--	-----

A. S. Kuznetsova, K. F. Tirronen, D. V. Panchenko, J. Schregel, E. A. Khizhkin. EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF SAMPLING AND PRESERVING METHODS FOR NON-INVASIVE SAMPLES WHEN BROWN BEAR POPULATION-GENETIC STUDIES ARE CONDUCTING	113
--	-----

SHORT COMMUNICATIONS

A. G. Kizhina, S. N. Sergina, L. B. Uzenbaeva, V. A. Ilyukha, E. F. Pechorina, E. P. Antonova, A. E. Yakimova, D. V. Panchenko. MORPHOMETRIC PARAMETERS OF ERYTHROCYTES IN SEVERAL RODENTIA SPECIES.	123
---	-----

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	133
--------------------------------	-----

Научный журнал

**Труды Карельского научного центра
Российской академии наук**
№ 6, 2019

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 20.06.2019. Дата выхода 30.06.2019. Формат 60x84¹/₈.
Печать офсетная. Уч.-изд. л. 14,5. Усл. печ. л. 16,2.
Тираж 100 экз. Заказ 564. 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