

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 74 · № 3 · 2019 · ИЮЛЬ — СЕНТЯБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные исследования

- Басс М.В., Армеев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К.
Влияние онкомутаций и посттрансляционных модификаций гистона H1 на структуру и стабильность хроматосомы 156
- Горемыкина Е.В., Рябышева А.А. Пространственное распределение склеренхимы в листовых пластинках некоторых овсяниц (*Festuca* L., Gramineae Juss.) 163
- Дмитриева Е.В. Экспериментальное исследование эмбрионального развития серой жабы (*Bufo bufo*): методические аспекты 170
- Дудова К.В., Джатдоева Т.М., Дудов С.В., Ахметжанова А.А., Текеев Д.К., Онипченко В.Г.
Конкурентная стратегия растений субальпийского высокогорья Северо-Западного Кавказа 179
- Киселевский Д.Б., Самуилов В.Д. Проницаемость плазматической мембраны для йодида пропидия и разрушение ядер клеток в эпидермисе листьев гороха: действие полиэлектролитов и детергентов. 188
- Коровов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Маркушева Т.В. Использование нового штамма-деструктора *Bacillus mobilis* 34Т для очистки почвы от 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты. 195
- Малюченко Н.В., Котова Е.Ю., Кирпичников М.П., Студитский В.М., Феофанов А.В. Связывание PARP1 с разрывами и шпильками на ДНК изменяет структуру нуклеосом. 200
- Моргунова Г.В., Кармушаков А.Ф., Клебанов А.А., Хохлов А.Н. Изучение влияния «мягкого разобщения» 2,4-динитрофенолом на рост и гибель в стационарной фазе культуры клеток китайского хомячка 207
- Пустовит К.Б., Малолина Е.А. Эффекты активации α_1 -адренорецепторов в межпредсердной перегородке у новорожденных и взрослых крыс 215

Столяров А.П. Особенности видовой, пространственной и трофической структуры макробентоса в лагунных экосистемах Ермолинской и Никольской губ (Кандалакшский залив, Белое море)	222
Яковлев Л.В., Сыров Н.В., Морозова Е.Ю., Каплан А.Я. Кортикоспинальная возбудимость человека при представлении движений в сопряжении с функциональной электростимуляцией	229

CONTENTS

Research articles

- Bass M.V., Armeev G.A., Shaitan K.V., Shaytan A.K.
The impact of oncomutations and post-translational modifications of linker histone H1 on the chromatosome structure and stability 156
- Goremykina E.V., Ryabysheva A.A. Spatial distribution of sclerenchyma in leaf blades of some fescues (*Festuca* L., Gramineae Juss.) 163
- Dmitrieva E.V. Experimental study of the embryonic development of common toad (*Bufo bufo*): methodological aspects. 170
- Dudova K.V., Dzhatdоеva T.M., Dudov S.V., Akhmetzhanova A.A., Tekeev D.K., Onipchenko V.G. Competitive strategy of the subalpine tallgrass species of Northwest Caucasus 179
- Kiselevsky D.B., Samuilov V.D. Permeability of the plasma membrane for propidium iodide and destruction of cell nuclei in the epidermis of pea leaves: the effect of polyelectrolytes and detergents 188
- Korobov V.V., Zhurenko E.I., Zharikova N.V., Iasakov T.R., Markusheva T.V. Application of the new degrader strain *Bacillus mobilis* 34T for soil clearing from 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid . . 195
- Malyuchenko N.V., Kotova E.Yu., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. PARP1 binding to DNA breaks and hairpins alters nucleosome structure 200
- Morgunova G.V., Karmushakov A.F., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Study of effect of «mild uncoupling» by 2,4-dinitrophenol on growth and death of culture of Chinese hamster cells in the stationary phase 207
- Pustovit K.B., Malolina E.A. α_1 -Adrenoreceptors' activation effects in the interatrial septum myocardium in newborn and adult rats 215
- Stolyarov A.P. Some features of the species, spatial and trophic structure of macrobenthos in the lagoon ecosystems of the Ermolinskaya and Nikolskaya Lips (Kandalaksha Bay, White Sea). 222
- Yakovlev L.V., Syrov N.V., Morozova E.Y., Kaplan A.Y. The corticospinal excitability influenced by motor imagery and simultaneous electrical stimulation 229

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.323

ВЛИЯНИЕ ОНКОМУТАЦИЙ И ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ ГИСТОНА H1 НА СТРУКТУРУ И СТАБИЛЬНОСТЬ ХРОМАТОСОМЫ**М.В. Басс, Г.А. Армеев, К.В. Шайтан, А.К. Шайтан****Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: alex@intbio.org*

С помощью биоинформатического анализа исследована стабильность хроматосомы при введении в структуру линкерного гистона посттрансляционных модификаций и мутаций, наблюдаемых в случаях онкологических заболеваний. Хроматосома образуется при взаимодействии линкерного гистона с нуклеосомой. Это взаимодействие может быть охарактеризовано величиной свободной энергии связывания. Мы предположили, что онкомутации и посттрансляционные модификации линкерного гистона ассоциированы с изменением свободной энергии связывания с ним нуклеосомы и, вероятно, приводят к изменению компактизации хроматина, таким образом влияя на экспрессию генов. Расчеты свободной энергии связывания проводились с помощью алгоритмов программы FoldX. Также был проведен скрининг положений посттрансляционных модификаций линкерного гистона на наличие стерических ограничений. Анализ полученных данных позволил выявить онкомутации и посттрансляционные модификации, которые существенно меняют свободную энергию связывания линкерного гистона с нуклеосомой, тем самым, возможно, влияя на структуру хроматина в целом.

Ключевые слова: нуклеосома, хроматин, свободная энергия, ДНК, гистоны, мутации, посттрансляционные модификации

В то время как контурная длина молекул ДНК в эукариотических клетках измеряется метрами, размеры клеточных ядер находятся в микрометровом диапазоне. Эта компактизация включает ряд независимых уровней упаковки. Первичным уровнем упаковки является суперспирализация двойной спирали ДНК в нуклеосомах, которые состоят из ДНК и октамера гистонов, сформированного тетрамером гистонов (H3–H4)₂ и двумя димерами гистонов H2A–H2B. Линкерный гистон (H1/H5) связывается с входящим и выходящим из нуклеосомы участками ДНК и стабилизирует нуклеосому.

Линкерный гистон (ЛГ) имеет длину около 220 аминокислотных остатков (а.о.) и состоит из трех структурных доменов: неструктурированного N-концевого домена длиной около 40 а.о., консервативного глобулярного домена (ГД) длиной около 80 а.о. и неструктурированного C-концевого домена длиной около 100 а.о. Из-за высокой подвижности C- и N-концевых доменов методами рентгеноструктурного анализа

определена структура только ГД ЛГ [1, 2]. Место расположения ГД H1 на нуклеосоме до сих пор является предметом обсуждения: выделяются конфигурации «на диаде», т.е. на оси псевдосимметрии второго порядка, которая проходит через центр нуклеосомной ДНК, и «вне диады», т.е. вне данной оси псевдосимметрии. В данный момент в базах данных PDB опубликована атомистическая структура с ГД только в конфигурации «на диаде». Стоит отметить, что мутация нескольких ключевых аминокислот может переключать один тип связывания на другой [3].

ЛГ H1 в большинстве видов представлен сразу несколькими генами, так называемыми гистоновыми вариантами. У человека известно 11 вариантов гистона H1 (H1.0–H1.10) [4]. Некоторые варианты ЛГ являются специфичными только для млекопитающих, в то время как для ЛГ H1.0 известны гены-ортологи у более эволюционно удаленных организмов (рыбы, птицы, насекомые). В большинстве типов соматических клеток человека самыми распространенными ва-

риантами линкерного гистона H1 являются H1.2 и H1.4 [5, 6].

Мутации в генах линкерных гистонов влияют на компактизацию хроматина и регуляцию экспрессии генов. Показано, что фолликулярная лимфома почти в трети случаев ассоциирована с мутациями в генах ЛГ человека [7]. Кроме того, укороченный из-за мутации в С-концевом домене гистон H1.4 связан с умственной отсталостью [8]. Мутации в гене ЛГ H1.5 ассоциированы с колоректальным раком [9].

Посттрансляционные модификации (ПТМ) ЛГ являются важной частью регуляции состояния хроматина. Известно, что фосфорилирование гистона H1 является необходимым условием при прохождении клетки через митоз. Ингибирование фосфорилирования ЛГ приводит к декомпактизации хроматина [10]. Фосфорилирование остатков серина и треонина ЛГ приводит к уменьшению его аффинности к ДНК [11]. Известно, что цитруллинирование аргинина-54 ЛГ H1.2 принимает участие в регуляции некоторых генов плюрипотентности, в том числе гена *NANOG*. Снижение положительного заряда гистона и уменьшение возможности образовывать водородные связи при цитруллинировании приводят к деконденсации хроматина и, как следствие, повышению уровня транскрипции [12]. Бета-гидроксибутирилирование и 2-гидроксиизобутирилирование лизина в ЛГ приводит не только к потере положительного заряда, но и к значительному увеличению размера модифицированной аминокислоты, что может влиять на взаимодействие ЛГ как с ДНК, так и с нуклеосомой [13, 14].

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что вариации последовательности гистона H1 играют важную роль в модуляции работы хроматина. В то же время механистическая картина влияния вариаций ЛГ на структуру хроматосомы и хроматина остается неясной и требует дальнейшего исследования. Недавние экспериментальные данные показывают, что онкомутации генов коровых гистонов зачастую совпадают с сайтами ПТМ [15]. Таким образом, мутации могут блокировать возможность посттрансляционной модификации и соответствующую естественную регуляцию аффинности ЛГ и нуклеосомы. Изучение влияния ПТМ линкерного гистона H1 на стабильность хроматосомы в этой связи также может предоставить информацию о перестройках структуры хроматина в раковых клетках.

В данной работе был произведен вычислительный анализ влияния различных ПТМ и он-

комутаций генов ЛГ H1 на структуру хроматосомы. В ходе скрининга были отобраны вариации, увеличивающие или уменьшающие стабильность структур хроматосом.

Материалы и методы

Аминокислотные последовательности ЛГ H1 были загружены из базы данных HistoneDB [4]. Для моделирования по гомологии использовалась программа MODELLER [16]. Модели хроматосомы в конфигурации «на диаде» были получены на основании кристаллической структуры хроматосомы из банка RCSB PDB (pdb ID 4qlc) [1]. Для исследуемых с помощью мо-

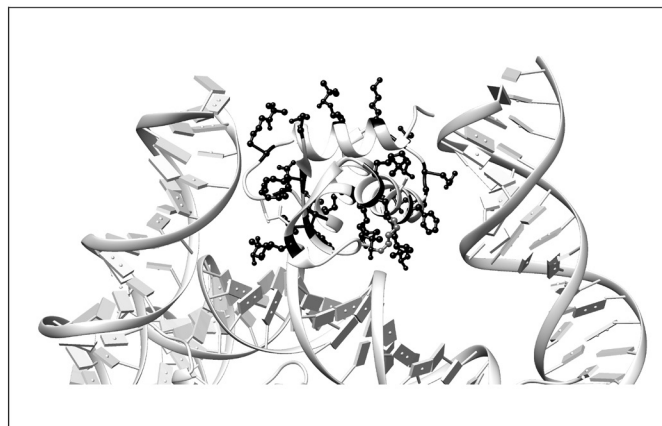


Рис. 1. В виде элементов вторичной структуры показан внешний вид модели линкерного гистона H1.2 в конфигурации «на диаде» и нуклеосомы. Черным цветом выделены исследуемые онкомутации и посттрансляционные модификации.

делирования по гомологии ЛГ было построено по пять моделей, из которых в соответствии с DOPEscore были отобраны наилучшие структуры (рис. 1) [16]. Дальнейшая оптимизация полученных структур проводилась с помощью программы FoldX [17].

В работе изучались онкомутации генов ЛГ, встречающиеся более одного раза в базе данных соматических мутаций COSMIC [18]. Были проанализированы онкомутации генов *HIST1H1C*, *HIST1H1E* и *HIST1H1B* гистонов H1.2, H1.4 и H1.5 соответственно. Анализ патогенности онкомутаций проводился с помощью предсказательного алгоритма PolyPhen-2. Алгоритмом машинного обучения на основе наивного байесовского классификатора мутации были распределены на три группы: вероятно опасные, возможно опасные и безопасные [19].

Сведения об исследуемых в работе ПТМ были взяты из базы данных белков UniProt [20]. Получение структур хроматосом с ПТМ проводилось с помощью веб-сервера Vienna-PTM [21]. Также некоторые ПТМ были собраны в про-

грамме Avogadro и затем присоединены к хроматоме в программе Chimera [22, 23].

Изменение свободной энергии связывания ΔG мутированного или посттрансляционно модифицированного гистона H1 с нуклеосомой рассчитывалось с помощью программы FoldX на основе эмпирического силового поля. В приближении силового поля FoldX свободная энергия разворачивания белка (или белкового комплекса) ΔG представляется в виде суммы вкладов, отвечающих за взаимодействия Ван-дер-Ваальса между атомами, энергию сольватации полярных и гидрофобных групп, энергию образования внутри- и межмолекулярных водородных связей, электростатическое взаимодействие заряженных групп, а также энтропийных вкладов, описывающих фиксацию основной и боковых цепей полипептида в ходе сворачивания. Свободная энергия связывания двух молекулярных комплексов А и В $\Delta G_{связ}$ рассчитывается по формуле (1):

$$\Delta G_{связ} = \Delta G_{AB} - (\Delta G_A + \Delta G_B), \quad (1)$$

где ΔG_{AB} — свободная энергия формирования молекулярного комплекса АВ относительно развернутого состояния; ΔG_A , ΔG_B — свободная энергия формирования структур А или В относительно развернутого состояния.

Для оценки влияния мутации или ПТМ на стабильность комплекса рассчитывается величина, равная разнице энергии связывания комплекса с мутацией и без мутации (2):

$$\Delta \Delta G_{связ} = \Delta G_2 - \Delta G_1, \quad (2)$$

где ΔG_2 — свободная энергия связывания комплексов с мутацией; ΔG_1 — свободная энергия связывания комплексов без мутации.

Для неузнаваемых алгоритмами FoldX ПТМ был проведен скрининг их положений в программе Chimera путем вращения торсионных углов боковой цепи модифицированной аминокислоты и определения наличия стерических ограничений, влияющих на возможность посттрансляционного модифицирования [23].

Результаты и обсуждение

Был проведен анализ базы данных UniProt для выявления известных сайтов и типов ПТМ гистона H1. Большинство ПТМ относятся к N-или C-концевым доменам ЛГ. В работе мы сфокусировались на исследовании ПТМ в области ГД, поскольку для данного домена ЛГ доступна кристаллическая структура. Основными типами модификации ПТМ ЛГ являются фосфорилирование, ацетилирование и бета-гидроксибутирирование. В рассмотренных нами ЛГ человека H1.2, H1.4 и H1.5 к ГД относятся лишь 44%, 39% и 41% сайтов ПТМ соответственно. Каждый из

данных вариантов ЛГ имеет по пять сайтов бета-гидроксибутирилирования, по одному сайту фосфорилирования и цитруллинирования (рис. 2А). Следует отметить, что, несмотря на родственность гистонов H1.2, H1.4 и H1.5, между ними наблюдаются определенные отличия в распределении ПТМ. Наиболее распространенными сайтами ПТМ в ГД гистона H1.2 являются сайты 2-гидроксиизобутирилирования: он содержит девять таких сайтов, т.е. 43% от сайтов ПТМ в данном домене. При этом наиболее часто встречающимися сайтами ПТМ в ГД гистонов H1.4 и H1.5 являются сайты бета-гидроксибутирилирования — 71% и 56% от сайтов ПТМ в ГД соответственно. Кроме того, отличительными особенностями ГД гистона H1.2 является наличие трех сайтов кротонилирования и одного сайта сукцинирования лизина, а в ГД гистона H1.5 — двух сайтов ацетилирования.

Большинство из выявленных ПТМ изменяют заряд аминокислоты, тем самым, вероятно, меняя аффинность ЛГ к нуклеосоме и ДНК, к примеру, за счет изменения электростатических взаимодействий. В частности, фосфорилирование остатков серина и треонина вносит дополнительный отрицательный заряд, уменьшая сродство к ДНК, а бета-гидроксибутирилирование и 2-гидроксиизобутирилирование лизина кроме нейтрализации положительно заряженной аминокислоты значительно увеличивают ее размер, вероятно, накладывая стерические ограничения. Кроме того, наличие гидроксила в этих ПТМ позволяет формировать дополнительные водородные связи, которые также могут способствовать связыванию эффекторных доменов белков хроматина.

Нами был проведен анализ базы данных мутаций в раковых клетках COSMIC. Для ГД ЛГ человека H1.2 было выявлено 73 уникальных точечных онкомутаций, для ЛГ H1.4 — 76, а для ЛГ H1.5 — 40. Известно, что мутации, накапливаемые в раковых клетках, могут являться как случайными, ввиду нарушенной работы системы репарации в клетке, так и мутациями-драйверами, которые являются первопричиной функциональных изменений в клетках [24]. Для того чтобы отсеять вероятно случайные точечные онкомутации, были выбраны только те мутации, информация о которых встречалась более одного раза в базе данных COSMIC. И для ГД гистона H1.2, и для ГД гистона H1.4 представлено по 20 таких мутаций, из которых 18 и 14 мутаций, соответственно, являлись миссенс-мутациями, то есть точечными мутациями, которые приводили к замене аминокислоты (рис. 2Б). Для ГД гисто-

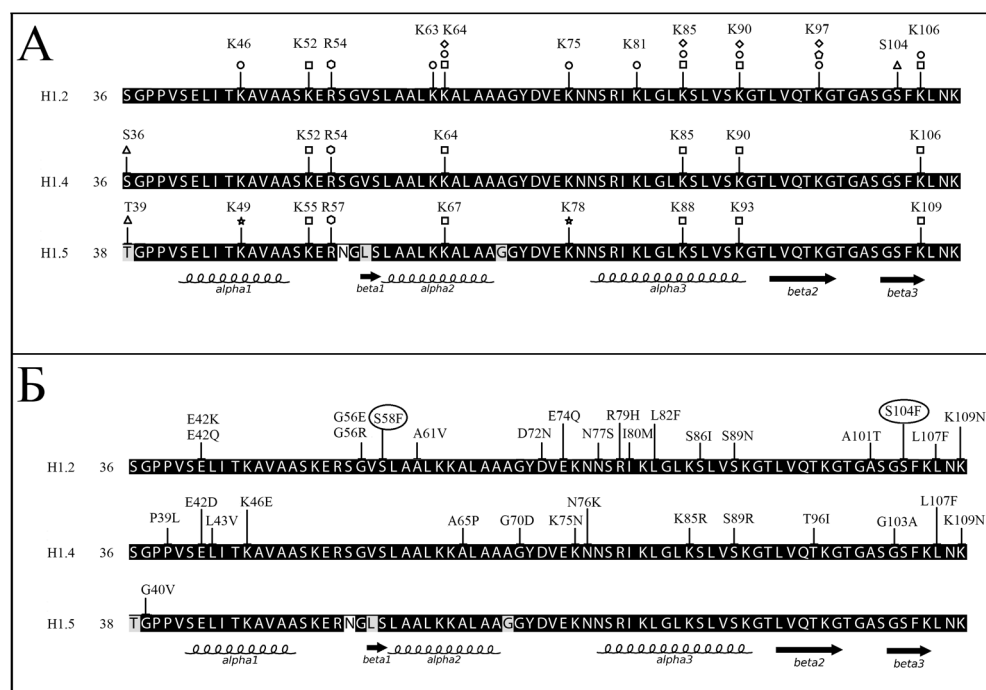


Рис. 2. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей глобулярных доменов линкерных гистонов H1.2, H1.4 и H1.5. **А** – Множественное выравнивание с указанием сайтов посттрансляционных модификаций. Кружками отмечены сайты 2-гидроксиизобутирилирования, треугольниками – фосфорилирования, квадратами – бета-гидроксибутирилирования, ромбиками – кротонылирования, пятиугольниками – сукцинирования, шестиугольниками – цитруллинирования, звездочками – сайты ацетилирования. **Б** – Множественное выравнивание с указанием исследуемых онкомутаций. Овалом отмечены онкомутации, приводящие к значительному изменению свободной энергии связывания линкерного гистона и нуклеосомы.

на H1.5 была выявлена лишь одна точечная мутация, удовлетворяющая критерию отбора. Особый интерес вызывали онкомутации генов ЛГ, находящиеся вблизи сайтов ПТМ, поскольку известно, что в большинстве коровых гистонов наиболее распространенные мутации совпадают с сайтами ПТМ [15]. Кроме того, известны совпадающая с сайтом ПТМ драйвер-мутация K27M и находящаяся вблизи сайта ПТМ драйвер-мутация G34R гистона H3.3, которые были выявлены в клетках глиобластомы человека [25]. Поскольку домены белков, распознающих ПТМ, могут взаимодействовать с набором окружающих ПТМ аминокислот (например, хромодомен, узнающий метилированный лизин, может взаимодействовать с шестью а.о., pdb ID 3QO2), то мутации в некотором диапазоне расстояний от сайта ПТМ, как и мутации самих сайтов ПТМ, также, вероятно, влияют на их работу. В ЛГ H1.2 онкомутация S104F совпадает с сайтом фосфорилирования. В диапазоне 2 а.о. от сайтов ПТМ находится 67% (12 из 18) известных миссенс-мутаций (S104F, G56R, G56E, A61V, E74Q, N77S, R79H, I80M, L82F, S86I, S89N, A101T). В гистоне H1.4 онкомутация K85R и nonsense-мутация K106X совпадают с сайтами ПТМ (цитруллини-

рование и бета-гидроксибутирилирование соответственно). Итого, 36% (5 из 14) мутаций расположены на расстоянии не более 2 а.о. от сайтов ПТМ (K85R, K106X, A65P, S89R, L107F).

С помощью алгоритмов программы FoldX было рассчитано изменение свободной энергии связывания $\Delta\Delta G$ нуклеосомы и ЛГ в случае фосфорилированной и немодифицированной аминокислоты. Только фосфорилирование серина-104 гистона H1.2 приводит к значительному увеличению свободной энергии связывания $\Delta\Delta G = 2,44$ ккал/моль. Это меньше свободной энергии диссоциации ЛГ, в присутствии 0,2 М NaCl составляющей $\Delta G = 8,5$ ккал/моль [26], однако в

разы превышает энергию $2kT = 1,19$ ккал/моль (согласно распределению Больцмана по энергии изменение энергии связывания на $2kT$ теоретически уменьшает вероятность связывания в e^2 раз) и может оказать существенное влияние на связывание.

Также был проведен скрининг положений ПТМ в случаях бета-гидроксибутирилирования и 2-гидроксиизобутирилирования лизина. Мы предположили, что часть из этих ПТМ может взаимодействовать с ДНК и участвовать в позиционировании ЛГ. Были определены сайты, в которых пространственное расположение модификации сильно ограничено соседними атомами, что может приводить к значительному проигрышу энтропии и повышению свободной энергии за счет пересечений вандерваальсовых радиусов атомов. В ЛГ H1.5 было выявлено большее количество сайтов бета-гидроксибутирилирования без жестких стерических ограничений: данные модификации лизина-88 и лизина-93 имели свободу вращения в отличие от других вариантов ЛГ. Бета-гидроксибутирилирование лизина-64, лизина-85 и лизина-90 гистонов H1.2 и H1.4, а также лизина-67, лизина-88 и лизина-93 гистона H1.5 может приводить к взаимодействию ПТМ с сахарофосфатным остовом ДНК. При-

соединение бета-гидроксibuтирила к лизину-52 и лизину-106 гистонов H1.2 и H1.4, а также к лизину-55 и лизину-109 ЛГ H1.5 может способствовать взаимодействию ПТМ как с сахарофосфатным остовом, так и с малой бороздкой ДНК. 2-Гидроксиизобутирирование лизина-97 приводит к возможному взаимодействию модификации с большой бороздкой и сахарофосфатным остовом ДНК, эта же модификация лизина-52, лизина-64, лизина-81, лизина-85 и лизина-90 — к потенциальному взаимодействию лишь с сахарофосфатным остовом ДНК. Мы предполагаем, что возникновение новых связей ПТМ как с сахарофосфатным остовом, так и с большой или малой бороздкой ДНК может служить позиционирующим фактором для ЛГ и, таким образом, влиять на связывание ЛГ с нуклеосомой.

Алгоритмы программы FoldX также использовались для расчета изменения свободной энергии связывания $\Delta\Delta G$ нуклеосомы и линкерных гистонов человека H1.2, H1.4 и H1.5, подвергнутых мутациям. Для гистона H1.2 замены S58F и S104F привели к наибольшему росту $\Delta\Delta G$ среди исследуемых онкомутаций (2,33 и 4,10 ккал/моль соответственно). Увеличение $\Delta\Delta G$ на 4,10 ккал/моль может привести к существенному росту несвязанных с ЛГ нуклеосом, тем самым, вероятно, открывая хроматин и повышая уровень транскрипции в клетке. Максимальную оценку потенциальной угрозы согласно предсказательному алгоритму PolyPhen-2 имеют 70% (23 из 33) изучаемых нами онкомутаций, в том числе и замены S58F и S104F в ЛГ H1.2. Интересно отметить, что наиболее часто встречающиеся (более двух раз) онкомутации генов ЛГ (H1.2: D72N, E74Q, I80M, S86I, K109N; H1.4: E42D, K75N)

незначительно меняют свободную энергию связывания. Следует также отметить, что по имеющимся экспериментальным данным и результатам компьютерного моделирования позиция ЛГ на нуклеосоме может изменяться при мутациях, приводящих к замене определенных а.о. ГД гистона H1, переключаясь с положения "на диаде" в положение "вне диады" [3]. В связи с этим не исключено, что некоторые онкомутации генов ЛГ, в том числе значительно изменяющие свободную энергию связывания, могут оказывать влияние и на конфигурацию хроматосомы.

Таким образом, в работе были проанализированы данные о ПТМ и онкомутациях глобулярного домена ЛГ, изучено их влияние на стабильность хроматосомы. Были определены ПТМ, при которых появляются дополнительные контакты ЛГ и ДНК. Можно предположить, что данные контакты обладают возможностью играть позиционирующую роль для ЛГ на нуклеосоме. Также на основе проведенного анализа выявлено, что некоторые онкомутации генов ЛГ имеют значительное влияние на его связывание с нуклеосомой. Возможно, такие мутации генов ЛГ оказывают воздействие на структуру упаковки хроматина и усиливают экспрессию проопухолевых генов. Дальнейшее изучение влияния ПТМ на структуру хроматосомы требует использование метода молекулярной динамики.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №19-74-30003). Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou B.-R., Jiang J., Feng H., Ghirlando R., Xiao T.S., Bai Y. Structural mechanisms of nucleosome recognition by linker histones // *Mol. Cell*. 2015. Vol. 59. N 4. P. 628–638.
2. Bednar J., Garcia-Saez I., Boopathi R., et al. Structure and dynamics of a 197 bp nucleosome in complex with linker histone H1 // *Mol. Cell*. 2017. Vol. 66. N 3. P. 384–397.
3. Gorkovets T.K., Armeev G.A., Shaitan K.V., Shaytan A.K. Joint effect of histone H1 amino acid sequence and DNA nucleotide sequence on the structure of chromatosomes: analysis by molecular modeling methods // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull*. 2018. Vol. 73. N 2. P. 82–87.
4. Draizen E.J., Shaytan A.K., Marico-Ramírez L., Talbert P.B., Landsman D., Panchenko A.R. HistoneDB 2.0: a histone database with variants—an integrated resource to explore histones and their variants // *Database (Oxford)*. 2016. Vol. 2016: baw014. DOI: 10.1093/database/baw014.
5. Kuzmichev A., Jenuwein T., Tempst P., Reinberg D. Different Ezh2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3 // *Mol. Cell*. 2004. Vol. 14. N 2. P. 183–193.
6. Th'ng J.P.H., Sung R., Ye M., Hendzel M.J. H1 family histones in the nucleus. Control of binding and localization by the C-terminal domain // *J. Biol. Chem*. 2005. Vol. 280. N 30. P. 27809–27814.

7. Li H., Kaminski M.S., Li Y., et al. Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D, and E; OCT2 (POU2F2); IRF8; and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma // *Blood*. 2014. Vol. 123. N 10. P. 1487–1498.
8. Tatton-Brown K., Loveday C., Yost S., et al. Mutations in epigenetic regulation genes are a major cause of overgrowth with intellectual disability // *Am. J. Hum. Genet.* 2017. Vol. 100. N 5. P. 725–736.
9. Sjöblom T., Jones S., Wood L.D., et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers // *Science*. 2006. Vol. 314. N 5797. P. 268–274.
10. Th'ng J.P., Guo X.W., Swank R.A., Crissman H.A., Bradbury E.M. Inhibition of histone phosphorylation by staurosporine leads to chromosome decondensation // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. N 13. P. 9568–9573.
11. Clausell J., Happel N., Hale T.K., Doenecke D., Beato M. Histone H1 subtypes differentially modulate chromatin condensation without preventing ATP-dependent remodeling by SWI/SNF or NURF // *PLOS One*. 2009. Vol. 4. N 10: e0007243.
12. Christophorou M.A., Castelo-Branco G., Halley-Stott R.P., Oliveira C.S., Loos R., Radziszewska A., Mowen K.A., Bertone P., Silva J.C.R., Zernicka-Goetz M., Nielsen M.L., Gurdon J.B., Kouzarides T. Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin // *Nature*. 2014. Vol. 507. N 7490. P. 104–108.
13. Dai L., Peng C., Montellier E., et al. Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark // *Nat. Chem. Biol.* 2014. Vol. 10. N 5. P. 365–370.
14. Xie Z., Zhang D., Chung D., et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lysine β -hydroxybutyrylation // *Mol. Cell*. 2016. Vol. 62. N 2. P. 194–206.
15. Nacev B.A., Feng L., Bagert J.D., Lemiesz A.E., Gao J., Soshnev A.A., Kundra R., Schultz N., Muir T.W., Allis C.D. The expanding landscape of 'oncohistone' mutations in human cancers // *Nature*. 2019. Vol. 567. N 7749. P. 473.
16. Webb B., Sali A. Protein structure modeling with MODELLER // *Protein Structure Prediction. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1137 / Eds. D. Kihara. N.Y.: Humana Press, 2014. P. 1–15.
17. Schymkowitz J., Borg J., Stricher F., Nys R., Rousseau F., Serrano L. The FoldX web server: an online force field // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33. Suppl. 2. P. W382–W388.
18. Tate J.G., Bamford S., Jubb H.C., et al. COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47. N D1. P. D941–D947.
19. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. A method and server for predicting damaging missense mutations // *Nature Methods*. 2010. Vol. 7. N 4. P. 248–249.
20. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47. N D1. P. D506–D515.
21. Margreitter C., Petrov D., Zagrovic B. Vienna-PTM web server: a toolkit for MD simulations of protein post-translational modifications // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41. N W1. P. W422–W426.
22. Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G.R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform // *J. Cheminform.* 2012. Vol. 4: 17.
23. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* 2004. Vol. 25. N 13. P. 1605–1612.
24. Bozic I., Antal T., Ohtsuki H., Carter H., Kim D., Chen S., Karchin R., Kinzler K.W., Vogelstein B., Nowak M.A. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. Vol. 107. N 43. P. 18545–18550.
25. Schwartzentruber J., Korshunov A., Liu X.Y., et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma // *Nature*. 2012. Vol. 482. N 7384. P. 226–231.
26. Kumar N.M., Walker I.O. The binding of histones H1 and H5 to chromatin in chicken erythrocyte nuclei // *Nucleic Acids Res.* 1980. Vol. 8. N 16. P. 3535–3552.

Поступила в редакцию 31.05.2019 г.

После доработки 04.07.2019 г.

Принята в печать 15.07.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

THE IMPACT OF ONCOMUTATIONS AND POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF LINKER HISTONE H1 ON THE CHROMATOSOME STRUCTURE AND STABILITY

M.V. Bass, G.A. Armeev, K.V. Shaitan, A.K. Shaytan*

Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

**e-mail: alex@intbio.org*

In this work, we investigated the chromosome stability under the influence of oncomutations and post-translational modifications. A chromosome is formed during the interaction of a nucleosome with linker histone. This interaction may be characterized by the binding free energy. We hypothesized that oncomutations may be associated with changing of the binding free energy and subsequent changes in chromatin compaction state and gene expression levels. Calculations of the binding free energy were performed using the FoldX program algorithms. Screening of the positions of post-translational modifications for potential steric constraints was also performed. The analysis of the data allowed us to identify the oncomutations and post-translational modifications, which can significantly change the binding free energy of the linker histone with the nucleosome, thereby, possibly, affecting the structure of chromatin.

Keywords: *nucleosomes, chromatin, free energy calculations, DNA, histones, mutations, post-translational modifications*

Сведения об авторах

Басс Михаил Витальевич — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-35; e-mail: *mbassmephi@gmail.com*

Армеев Григорий Алексеевич — канд. физ-мат. наук, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: *armeev@intbio.org*

Шайтан Константин Вольдемарович — докт. физ-мат. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: *shaytan49@yandex.ru*

Шайтан Алексей Константинович — канд. физ-мат. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: *alex@intbio.org*

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 581.84:582.542.1

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СКЛЕРЕНХИМЫ В
ЛИСТОВЫХ ПЛАСТИНКАХ НЕКОТОРЫХ ОВСЯНИЦ
(*FESTUCA* L., GRAMINEAE JUSS.)

Е.В. Горемыкина*, А.А. Рябышева

*Институт естественных наук, Волгоградский государственный университет, Россия, 400062, г. Волгоград, просп. Университетский, д. 100***e-mail: goremykina.eugenia@gmail.com*

Анатомические особенности листьев считаются важными диагностическими признаками для определения злаков. С этой целью традиционно используют срезы в срединной части листовой пластинки. Анатомия листа представляет ключевой интерес для определения представителей рода овсяница *Festuca* L. из-за значительного внешнего сходства между видами, особого внимания заслуживают особенности расположения склеренхимы на срединных срезах их листовых пластинок. Существующий дефицит сведений о пространственном расположении тканей внутри листа злаков не позволяет в полной мере оценить диагностическую значимость информации, которую даёт единственное двумерное сечение листовой пластинки. Целью проведённого исследования было создание трёхмерных моделей склеренхимы по серии срезов, а также выявление количественных закономерностей распределения склеренхимы вдоль листовых пластинок у двух узколистных овсяниц *Festuca valesiaca* Gaud. и *Festuca beckeri* (Hack.) Trautv. У обоих видов площадь сечения склеренхимы увеличивается на небольшом участке выше пластинчато-влагалищного сочленения и затем постепенно уменьшается до кончика листа. Субэпидермальная склеренхима исследованных овсяниц имеет вид неравномерного слоя – почти сплошного у *F. beckeri* и рассечённого четырьмя протяжёнными трещинами у *F. valesiaca*. Изменения формы сечений склеренхимы от пластинчато-влагалищного сочленения до кончика листа более выражены у *F. valesiaca*, чем у *F. beckeri*. Изменчивость расположения склеренхимы вдоль листовых пластинок следует учитывать при использовании двумерных сечений листа для диагностики овсяниц.

Ключевые слова: злаки, овсяницы, анатомия листовых пластинок, склеренхима, диагностические признаки, трёхмерное строение тканей листа

Признаки анатомической структуры листьев широко используются для решения таксономических и диагностических задач при исследовании злаков. При этом большая часть работ, связанная с анатомией листа злаков, традиционно опирается на данные, которые относятся к поперечному срезу в срединной части листовой пластинки [1–8]. Для сравнительно-анатомических исследований листьев злаков разработана стандартная процедура, согласно которой следует использовать срединную часть пластинки, и предложена терминология для описания срединного среза [9].

Анатомические особенности активно используются в таксономическом анализе представителей рода овсяница *Festuca* L. Определение овсяниц затруднено из-за значительного

внешнего сходства между видами этого рода. Характер распределения склеренхимы считается одним из наиболее ценных признаков для определения узколистных овсяниц [10–14]. У представителей этой группы склеренхима может располагаться как под верхней, так и под нижней эпидермой листовой пластинки, склеренхимные волокна образуют непрерывные слои или отдельные тяжи разных размеров и очертаний, у некоторых видов субэпидермальная склеренхима может контактировать с проводящими пучками. Различные варианты контура сечения механической ткани характерны для групп видов или иногда для отдельных видов овсяниц [11, 15]. Есть указания на внутривидовую изменчивость особенностей распределения склеренхимы, которая выявляется при сравне-

нии большого количества образцов из разных местообитаний, что показано для *F. rubra* и *F. ovina*, обитающих на Британских островах [14], для ряда узколистных овсяниц флоры Уганды [4] и флоры Канады [1, 12]. По мнению Стейса и соавт. [14], характер распределения склеренхимы, несмотря на изменчивость, может быть полезен для идентификации овсяниц, если известны границы варьирования этого признака.

Следует отметить, что в ряде исследований участки срезов листовых пластинок овсяниц не являются строгой геометрической серединой. В таких случаях авторы указывают границы, в пределах которых находится срез: например, используют зону между четвертью и половиной листовой пластинки [12, 13], среднюю треть листовой пластинки [10] или даже нижнюю треть пластинки [16]. Насколько сравнимы будут результаты таких исследований с результатами, полученными при анализе срединного сечения пластинки, — вопрос открытый. Смещение относительно середины предполагает однородное строение листовой пластинки, но в настоящее время нам не известны работы, в которых исследовано расположение тканей по всей длине листовых пластинок злаков или хотя бы в пределах участка, использованного для выполнения поперечных срезов. Исключение представляет работа Дуби и Мориссе [1], изучавших морфолого-анатомические особенности *Festuca rubra* L. из разных местообитаний провинции Квебек. В предварительных исследованиях авторов была выявлена однородность анатомической структуры в средней части листовой пластинки, однако подробности полученных результатов, в частности, размер средней части, не уточняются. Изучение анатомической структуры листьев ряда степных злаков в основании, а также средней и верхней частях пластинки показало, что расположение тканей на срезе может значительно меняться от пластинчато-влагалищного сочленения до концевого участка [17]. Существующий дефицит сведений о пространственном расположении тканей внутри листа злаков не позво-

ляет в полной мере оценить диагностическую значимость информации, которую даёт единственное двумерное сечение листовой пластинки.

Целью проведенного исследования было создание трёхмерных моделей склеренхимы по серии срезов листовых пластинок, а также выявление количественных закономерностей распределения склеренхимы вдоль листовых пластинок у двух узколистных представителей рода овсяница *Festuca* L.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили широко распространённые в Нижнем Поволжье овсяница Беккера *Festuca beckeri* (Hack.) Trautv. и овсяница валлисая *Festuca valesiaca* Gaud. Оба вида имеют жизненную форму плотнокустовых злаков, образующих многочисленные укороченные вегетативные побеги.

Материал был собран в июне 2013–2014 гг. на остепнённых участках в Урюпинском районе Волгоградской области и в черте г. Волгограда в окрестностях Волгоградского государственного университета. Вегетативные побеги фиксировали в 95%-ном этаноле. Для анатомического исследования случайным образом выбирали по три листа с пяти дерновин каждого вида. Для приготовления серии срезов листовые пластин-

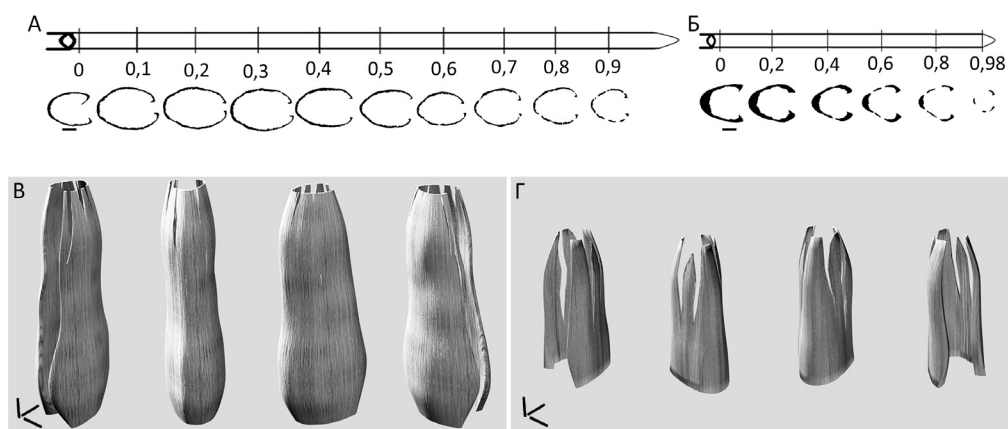


Рис. 1. Пространственное распределение склеренхимы в листовых пластинках исследованных овсяниц: участки сечений и соответствующие контуры механической ткани, использованные для построения трёхмерных моделей склеренхимы *F. beckeri* (А) и *F. valesiaca* (Б), трёхмерная реконструкция склеренхимы *F. beckeri* (В) и *F. valesiaca* (Г). Пропорции моделей изменены: высота уменьшена по сравнению с шириной в 100 раз, чтобы изображения целиком помещались в поле зрения. Горизонтальные масштабные линии соответствуют 0,2 мм, вертикальные масштабные линии соответствуют 20 мм.

ки *F. beckeri* длиной 20–27 см делили на 10 равных частей, листовые пластинки *F. valesiaca*, которые обычно были короче в 1,5–2 раза, делили на 5 равных частей. Поперечные срезы выполняли от руки на границах выделенных

участков (рис. 1А, Б), расстояние между соседними срезами у каждого объекта составляло 2–3 см.

Срезы окрашивали с помощью флороглюциновой реакции и заключали в глицерин. Фотографии срезов получены с помощью микроскопа Микмед-5 (ЛОМО, Россия), цифрового видеоокуляра ToupCam 9.0 и программы ToupView 3.7 (Ningbo Sheng Heng Optics & Electronics Co., Ltd., Китай). Измерения площади склеренхимы на основе фотографий и статистическая обработка данных выполнены с помощью Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe Systems, США) и STATISTICA 10 (StatSoft, США). Трёхмерная реконструкция склеренхимы листовых пластинок выполнена в Blender 2.79 (Blender Foundation, Нидерланды).

обкладку пучка. Последняя одревесневает полностью или частично рядом с границей между ксилемой и флоэмой. У некоторых образцов *F. beckeri* отмечено слабое одревеснение эпидермы и склеренхимы, но при этом сохраняется хорошо выраженная лигнификация устьичных клеток и элементов ксилемы.

На уровне нулевого сечения существенные различия между исследованными овсяницами состоят в количестве пучков (9–13 у *F. beckeri* и 5 у *F. valesiaca*), а также в очертании склеренхимы.

Склеренхима *F. beckeri* расположена в виде сплошного более или менее равномерного слоя, который немного утолщается в центральной части и в краевых участках пластинки, не контактируя с проводящими пучками. Под верхней

эпидермой механическая ткань чаще отсутствует, но у некоторых образцов отмечено наличие тонких тяжёлых волокон на вершинах рёбер. Среднее значение площади сечения склеренхимы *F. beckeri* на нулевом срезе составляет 62962 мкм².

У *F. valesiaca* склеренхима располагается в виде трёх массивных тяжёлых (два — в краевых участках пластинки и один — под средней

жилкой), иногда контактирующих с крупными проводящими пучками. Между тяжёлыми обычно находятся тонкие связующие слои волокон, сплошные или с одним–двумя разрывами. У единичных образцов связующие слои отсутствуют. Средняя площадь сечения склеренхимы *F. valesiaca* на нулевом уровне среза составляет 49077 мкм².

От нулевого до последнего верхнего среза у обеих овсяниц меняются степень одревеснения тканей, количество пучков, а также площадь и очертания сечений склеренхимы.

Одревеснение обычно ослабевает снизу вверх в склеренхите и эпидерме (за исключением устьичных клеток). У части образцов *F. beckeri* с относительно слабым общим одревеснением на нулевом срезе степень лигнификации склеренхимы и эпидермы увеличивается в нижней трети пластинки, а затем убывает по направлению к кончику листа. У всех исследованных образцов от основания пластинки до её

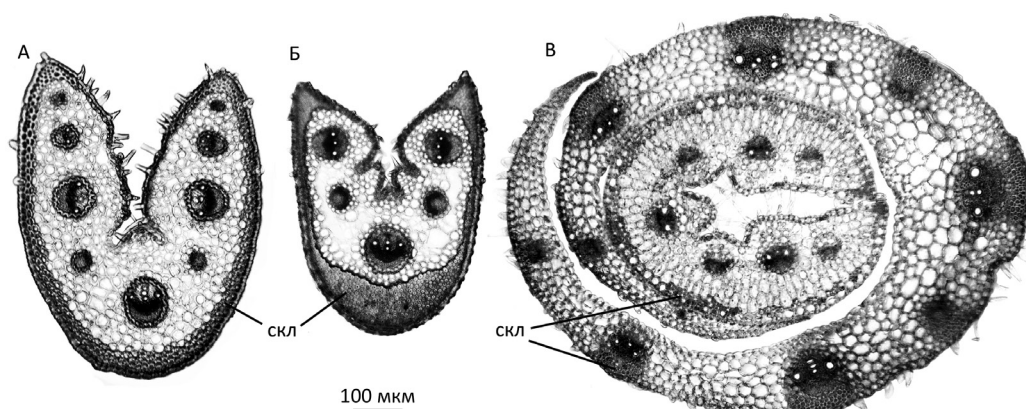


Рис. 2. Поперечные срезы листьев исследованных овсяниц: основания листовых пластинок *F. beckeri* (А) и *F. valesiaca* (Б), листовая пластинка внутри влагалища предыдущего листа *F. beckeri* (В); skl — субэпидермальная склеренхима.

Результаты и обсуждение

На срезах в районе пластинчато-влагалищного сочленения (далее — на нулевых срезах) листовые пластинки у исследованных овсяниц свёрнутые, гладкие с абаксиальной стороны и ребристые с адаксиальной (рис. 2). Лист эпистоматический, устьичные клетки расположены в бороздах.

Склеренхима обычно располагается под нижней эпидермой и в краях листовой пластинки. Мезофилл состоит из плотно расположенных клеток, межклетники мелкие. У обоих видов проводящие пучки фестукоидного типа. Клетки механической обкладки пучков с утолщенными внутренними и радиальными стенками. Помимо крупных пучков с развитой метаксилемой присутствуют мелкие пучки, в которых метаксилема не выражена. Сильное одревеснение, как правило, затрагивает нижнюю эпидерму, участки верхней эпидермы на вершинах рёбер, устьичные клетки, склеренхиму, ксилему и

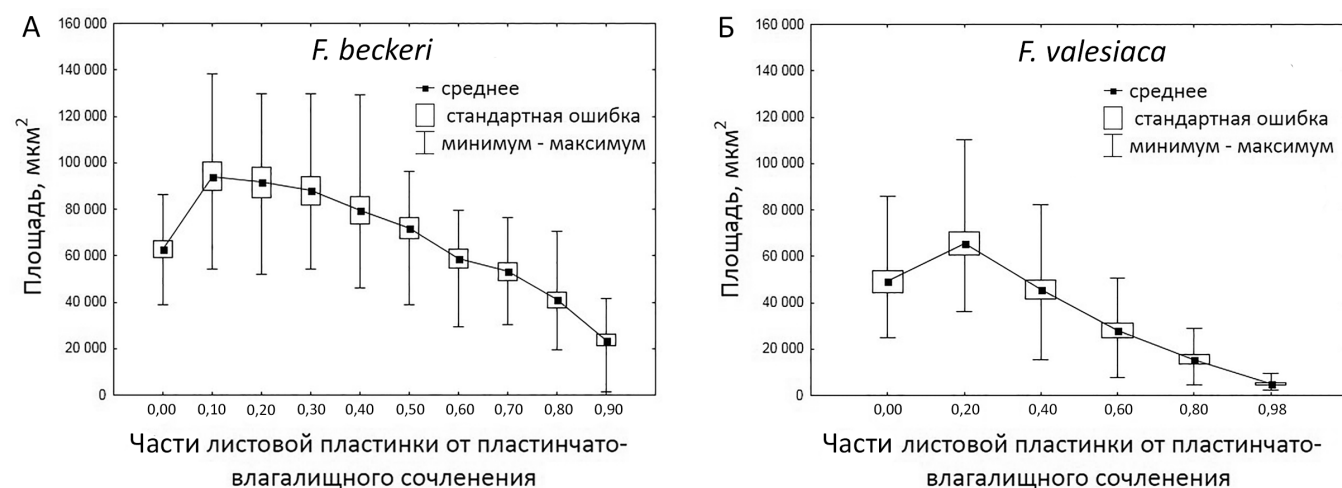


Рис. 3. Размах значений площади склеренхимы на разных уровнях срезов: А — *F. beckeri*, Б — *F. valesiaca*.

кончика сохраняется сильное одревеснение у элементов ксилемы и устьичных клеток.

Количество пучков обычно сокращается к последнему сечению до шести-деяти у *F. beckeri* и до трёх-четырёх у *F. valesiaca* за счёт исчезновения мелких пучков. Такое исчезновение происходит у *F. valesiaca* только на самых верхних срезах, тогда как у *F. beckeri* мелкие пучки начинают исчезать на срезах выше срединного.

У обеих овсяниц выявлен сходный характер зависимости между количеством склеренхимы и расстоянием от пластинчато-влагалищного сочленения: на небольшом участке от нулевого до следующего среза площадь сечения механической ткани резко возрастает (в среднем до 94066 мкм² у *F. beckeri* и до 65476 мкм² у *F. valesiaca*), после чего постепенно уменьшается по направлению к верхушке листа (в среднем до 23682 мкм² у *F. beckeri* и до 4815 мкм² у *F. valesiaca*; рис. 3). Распределение выборочных значений площади склеренхимы на каждом уровне среза достоверно не отличается от нормального распределения согласно тесту Шапиро–Уилка ($p > 0,05$). Статистически значимые различия между средними значениями площади на нулевом и следующем срезе подтверждены t -тестом при $p < 0,05$ для обеих овсяниц. Выше участка между нулевым и следующим за ним срезом достоверность тесной отрицательной корреляции между площадью сечения склеренхимы и уровнем среза подтверждена тестом Спирмана: коэффициент корреляции составил $-0,77$ для *F. beckeri* и $-0,90$ для *F. valesiaca* ($p < 0,05$).

Наращивание объёма склеренхимы на небольшом участке над пластинчато-влагалищным сочленением, вероятно, имеет общую при-

чину: переход от механически слабого влагалища к жёсткой листовой пластинке. Влагалище само по себе не обладает большой жёсткостью и прочностью. Количество механических тканей в нём невелико: узкие склеренхимные тяжи присутствуют в виде небольших балок, контактирующих с нижней эпидермой и проводящими пучками (рис. 2В). Однако при объединении нескольких влагалищ, которые у укороченных вегетативных побегов злаков оборачиваются вокруг последующих листьев, суммарно возникает достаточно прочная конструкция. Листовым пластинкам исследованных овсяниц необходима гораздо большая прочность, чем их влагалищам, чтобы самостоятельно поддерживать вертикальное положение, характерное для пластинок плотнокустовых злаков. Перестройка механической системы листа происходит на небольшом участке выше пластинчато-влагалищного сочленения. Эта механически слабая зона пластинки спрятана внутри влагалища предыдущего листа, что компенсирует недостаточно набранную прочность. По нашим наблюдениям, пластинчато-влагалищные сочленения и нижние части листовых пластинок последующих листьев, как правило, находились под защитой влагалищ предыдущих листьев.

Дальнейшее постепенное уменьшение объёма механической ткани, возможно, связано с тем, что внутри свободной части листовой пластинки склеренхима выполняет функции балки равного сопротивления. Такая сужающаяся конструкция из упругого материала пружинит при изгибе, равномерно распределяя напряжение по всей своей длине. В качестве балок равного сопротивления рассматривают конусовидные органы растений, в том числе стволы

деревьев, основную массу которых составляет более или менее однородная древесина. Благодаря пропорциям, близким к пропорциям балок равного сопротивления, удлинённые органы растений, толщина которых постепенно уменьшается снизу вверх, хорошо приспособлены к изгибающим нагрузкам, в том числе к ветровым. Эластичность подобных конструкций обеспечивает обратимую деформацию, при которой ось изгибается преимущественно в верхней части, не ломаясь в основании [18, 19]. Возможно, постепенное уменьшение площади сечения склеренхимы у свободной части пластинки отражает описанное выше механическое свойство, поскольку вертикально ориентированная пластинка испытывает нагрузки, сходные с теми, которым подвергается вертикальный стебель, однако подтверждение этого предположения требует дальнейших исследований.

Сходные количественные изменения объёма склеренхимы вдоль листовых пластинок по-разному сказываются на изменении очертаний сечений этой ткани у исследованных видов. Почти равномерный сплошной слой субэпидермальной склеренхимы *F. beckeri* немного утолщается в основании, при этом волокна механической ткани исчезают на вершинах рёбер. На остальной части пластинки склеренхима становится тоньше, на уровне верхних сечений могут появиться разрывы (рис. 1B). Однако на большей части пластинки конфигурации последовательных сечений существенно не меняются: практически на всех уровнях срезов, за исключением некоторых верхних, наблюдается всё тот же равномерный слой склеренхимы, который считается характерным для срединного сечения листовых пластинок *F. beckeri* и используется в качестве диагностического признака [15]. Если поперечный срез сместится на несколько сантиметров вверх или вниз относительно центра пластинки, явных изменений в характерной форме сечения склеренхимы *F. beckeri* не произойдёт.

Увеличение объёма неравномерного слоя склеренхимы *F. valesiaca* на участке между нулевым и следующим срезом может сопровождаться исчезновением разрывов в тонких слоях склеренхимы или, напротив, появлением новых. Контакты склеренхимы с проводящими пучками, если они были на нулевом срезе, могут исчезнуть, сохраниться или уменьшиться в количестве. В ряде случаев существенных изменений в очертании сечения склеренхимы не происходит.

На остальной части листовой пластинки неравномерный слой склеренхимы становится всё

тоньше, при этом очертания сечений механической ткани не перестают меняться на протяжении всей пластинки. Контакты между склеренхимой и проводящими пучками исчезают. В тонких слоях между массивными участками склеренхимы появляются и расширяются разрывы, их количество достигает двух в каждом тонком слое. В результате сплошной или почти сплошной слой склеренхимы, характерный для нижней части пластинки, постепенно раскалывается на пять отдельных тяжей: три более или менее массивных обособляются по краям пластинки и под средней жилкой, два узких и тонких находятся между ними (рис. 1Г). Протяжённость четырёх продольных трещин, которые разрезают слой склеренхимы *F. valesiaca* на отдельные тяжи, значительно варьирует у исследованных образцов. На сечениях в верхней части пластинки тяжи склеренхимы становятся всё тоньше, различия в размере между краевыми, центральными и промежуточными пучками сглаживаются, промежуточные тяжи становятся едва заметными.

Наличие трёх массивных участков склеренхимы, чередующихся с двумя тонкими, иногда отсутствующими участками, считается характерной особенностью распределения механической ткани *F. valesiaca* на срединном срезе [10, 15]. По нашим наблюдениям, более чем у половины образцов именно в середине пластинки происходит переход от неравномерного слоя склеренхимы с одним–двумя разрывами на уровне 0,4 части пластинки на каноническую 5-тяжевую конструкцию на уровне 0,6 части (рис. 1Б). Таким образом, небольшое смещение на 1–2 см от срединного участка даёт уже другую конфигурацию сечения склеренхимы. Трёхмерная картина, бесспорно, несёт больше информации о механической ткани листа, чем её единственное сечение из срединного или близкого к срединному участку листа.

Слабая изученность трёхмерной анатомической структуры растительных объектов — проблема не только агроэкологии. Пространственное расположение тканей растений остаётся в значительной степени неисследованным прежде всего потому, что реконструкция множества поперечных срезов вручную — крайне трудоёмкая задача. Такие перспективные методы, как рентгеновская компьютерная микротомография и метод ядерно-магнитного резонанса, позволяют получить трёхмерное изображение участков растительных органов, однако их применение с этой целью пока имеет ряд ограничений как технического, так и логистического характера [20–22]. При использовании традиционных методов анатомической обработки объектов в со-

четании с доступными программами 3D-моделирования задача трёхмерной реконструкции растительных тканей может быть в определённой степени решена для таких объектов, как листья злаков. В этом случае рутинные процедуры — приготовление срезов и фотографирование — будут единственной затратной по времени частью исследования, а трёхмерная реконструкция изображений будет ускорена с помощью соответствующих программ.

Таким образом, проведённое исследование выявило сходную количественную закономерность распределения склеренхимных волокон вдоль листовых пластинок *F. beckeri* и

F. valesiaca: площадь сечения склеренхимы увеличивается на небольшом участке в районе пластинчато-влагалищного сочленения и затем постепенно уменьшается до кончика листа. Изменения формы сечений склеренхимы вдоль листовой пластинки выражены в большей степени у *F. valesiaca*, чем у *F. beckeri*, что следует учитывать при использовании очертаний склеренхимы в качестве диагностических признаков.

Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dube M., Morisset P. Morphological and leaf anatomical variation in *Festuca rubra sensu lato* (Poaceae) from eastern Quebec // Can. J. Bot. 1987. Vol. 65. N 6. P. 1065–1077.
2. Ramesar-Fortner N.S., Aiken S.G., Dengler N.G. Phenotypic plasticity in leaves of four species of arctic *Festuca* (Poaceae) // Can. J. Bot. 1995. Vol. 73. N 11. P. 1810–1823.
3. Wrobel C., Coulman B.E., Smith D.L. An investigation into the anatomical differences between flat and folded leaves in reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.) // Can. J. Plant Sci. 2008. Vol. 88. N 2. P. 339–342.
4. Namaganda M., Krekling T., Lye K.A. Leaf anatomical characteristics of Ugandan species of *Festuca* L. (Poaceae) // S. Afr. J. Bot. 2009. Vol. 75. N 1. P. 52–59.
5. Dani M., Kovacs J.A. Leaf anatomical structures in Central European populations of the broad-leaved *Festuca* taxa // Acta Bot. Hung. 2014. Vol. 56. N 3–4. P. 275–291.
6. Leandro T.D., Shirasuna R.T., Filgueiras T.S., Scatena V.L. The utility of Bambusoideae (Poaceae, Poales) leaf blade anatomy for identification and systematics // Braz. J. Biol. 2016. Vol. 76. N 3. P. 708–717.
7. Leandro T.D., Scremin-Dias E., Arruda R. Micromorphology and anatomy of the leaf blade: a contribution to the taxonomy of *Luziola* (Poaceae, Oryzoideae) from the Pantanal, Brazil // Plant Syst. Evol. 2016. Vol. 302. N 3. P. 265–273.
8. Leandro T.D., Scatena V.L., Clark L.G. The contribution of foliar micromorphology and anatomy to the circumscription of species within the *Chusquea ramosissima* informal group (Poaceae, Bambusoideae, Bambuseae) // Plant Syst. Evol. 2017. Vol. 303. N 6. P. 745–756.
9. Ellis R.P. A procedure for standardizing comparative leaf blade anatomy in the Poaceae I. The leaf blade as viewed in transverse section // Brothalia. 1976. Vol. 12. N 1. P. 65–109.
10. Hosseini S.Z., Rahiminejad M.R., Saeidi H. Leaf anatomical structure of Iranian narrow-leaved species of the genus *Festuca* L. (Poaceae, Poaceae) // Iran. J. Bot. 2013. Vol. 10. N 1. P. 86–93.
11. Martinez-Sagarra G., Abad P., Devesa J.A. Study of the leaf anatomy in cross-section in the Iberian species of *Festuca* L. (Poaceae) and its systematic significance // PhytoKeys. 2017. Vol. 83. P. 43–74.
12. Aiken S.G., Darbyshire S.J., Lefkovitch L.P. Restricted taxonomic value of leaf sections in Canadian narrow-leaved *Festuca* (Poaceae) // Can. J. Bot. 1985. Vol. 63. N 6. P. 995–1007.
13. Zarinkamar F., Jouyandeh N.E. Foliar anatomy and micromorphology of *Festuca* L. and its taxonomic applications // Tax. Biosyst. 2011. Vol. 3. N 8. P. 55–63.
14. Stace C.A., Al-Bermani A.-K.K.A., Wilkinson M.J. The distinction between the *Festuca ovina* L. and *Festuca rubra* L. aggregates in the British Isles // Watsonia. 1992. Vol. 19. P. 107–112.
15. Алексеев Е.Б. Овсяницы Кавказа. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1980. 164 с.
16. Lopez J., Devesa J.A. Contribución al conocimiento de la anatomía foliar de las Aveneae (Poaceae, Pooideae) del centro-oeste de España // Anal. Jardin Bot. Mad. 1991. Vol. 48. N 2. P. 171–187.
17. Батырбекова Д.К., Горемыкина Е.В., Лосев А.А., Майоров С.А. Изменчивость анатомической структуры листовой пластинки у некоторых степных злаков // Бюл. МОИП. Отд. биол. 2015. Т. 120. N 8. С. 58–67.
18. Паутов А.А. Закономерность филломорфогенеза вегетативных органов растений. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2009. 220 с.

19. Niklas K.J. Plant biomechanics: an engineering approach to plant form and function. Chicago: Chicago Univ. Press, 1992. 628 p.

20. Brodersen C.R., Roddy A.B. New frontiers in the three-dimensional visualization of plant structure and function // Am. J. Bot. 2016. Vol. 103. N 2. P. 184–188.

21. Wang Z., Verboven P., Nicolai B. Contrast-enhanced 3D micro-CT of plant tissues using different impregnation techniques // Plant Methods. 2017. Vol. 13. N 105. P. 1–16.

22. Mathers A.W., Hepworth C., Baillie A.L., Sloan J., Jones H., Lundgren M., Fleming A.J., Sacha J., Mooney S.J., Sturrock C.J. Investigating the microstructure of plant leaves in 3D with lab based X ray computed tomography // Plant Methods. 2018. Vol. 14: 99.

Поступила в редакцию 13.05.2019 г.

После доработки 19.07.2019 г.

Принята в печать 25.07.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

SPATIAL DISTRIBUTION OF SCLERENCHYMA IN LEAF BLADES OF SOME FESCUES (*FESTUCA* L., GRAMINEAE JUSS.)

E.V. Goremykina*, A.A. Ryabysheva

*Institute of Nature Sciences, Volgograd State University, Universitetskiy prosp. 100,
Volgograd, 400062, Russia*

**e-mail: goremykina.eugenia@gmail.com*

Leaf anatomical characteristics are considered as important diagnostic features for identifying grasses. Cross sections in the middle part of the leaf blades have been traditionally used for such purposes. The leaf anatomy has been of key interest in diagnostics of fescues *Festuca* L. because of great morphological similarity between the species, particular attention is paid to the arrangement of sclerenchyma in the middle part of the leaf blades of fescues. The lack of knowledge regarding the spatial distribution of tissue throughout the leaf blades of grasses does not allow to evaluate the diagnostic significance of data obtained from the single two-dimensional cross section. The aim of the work is to make 3D models of sclerenchyma from serial sections of leaf blades of two narrow-leaved fescues *Festuca valesiaca* Gaud. and *Festuca beckeri* (Hack.) Trautv. We also attempted to find out the quantitative patterns of the distribution of sclerenchyma along the leaf blades of *F. beckeri* and *F. valesiaca*. Cross-sectional areas of sclerenchyma increase just above the blade/sheath junction and then gradually decrease up to tips of the leaf blades in both species. Subepidermal sclerenchyma of the fescues arranges in uneven layer. The layer of *F. beckeri* is more or less solid, the layer of *F. valesiaca* is dissected by four long splits. Changes in the shape of sclerenchyma sections along the leaf blades are more pronounced in *F. valesiaca* than in *F. beckeri*. Variability of the sclerenchyma arrangements along the leaf blades should be considered when using 2D sections of the leaf for diagnostics of fescues.

Keywords: *grasses, fescues, leaf blade anatomy, sclerenchyma, diagnostic features, three-dimensional structure of leaf tissues*

Сведения об авторах

Горемыкина Евгения Вячеславовна — канд. биол. наук, доц. кафедры биологии Волгоградского государственного университета. Тел.: 8-844-244-74-01;
e-mail: goremykina.eugenia@gmail.com

Рябышева Анастасия Александровна — бакалавр кафедры биологии Волгоградского государственного университета. Тел.: 8-844-244-74-01; e-mail: bot@volsu.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 597.841+574.21:611.013.9

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ СЕРОЙ ЖАБЫ (*BUFO BUFO*): МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**Е.В. Дмитриева**

*Кафедра биологической эволюции, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: dmitrieva@aport.ru*

Эмбриональные и личиночные стадии развития амфибий часто используются при проведении экспериментальных исследований в области биологии развития, токсикологии и медицины. Однако существующие методики проведения лабораторных экспериментов не учитывают особенности биологии модельных видов амфибий, а также не уделяют достаточного внимания стандартизации условий проведения экспериментов и минимизации влияния экспериментатора на их результат. Кроме того, не учитывается тот факт, что методика проведения экспериментальных исследований, разработанная для одного вида амфибий, не может использоваться для аналогичных исследований на другом виде без ее существенной модификации с учетом особенностей биологии данного объекта. В статье суммируются результаты многолетних исследований, посвященных изучению факторов, оказывающих влияние на результаты лабораторных экспериментов по изучению эмбриональных стадий развития серой жабы *Bufo bufo*. На примере этого вида разработаны новые методические подходы к проведению лабораторных исследований, позволяющие учитывать особенности биологии вида, минимизировать неоднородность воздействий ранее неконтролируемых факторов и стандартизировать условия проведения экспериментов. Рекомендуется на протяжении всего эксперимента поддерживать температуру на уровне 15°C, проводить регулярные измерения через одинаковые промежутки времени (8 ч), проводить каждое тестирование при двух значениях начальной плотности эмбрионов (рекомендуемые — 30 и 120 икринок в едином шнуре на стандартный аквариум). При постановке экспериментов следует учитывать влияние не только «объемной» (отношение количества эмбрионов к объему воды), но и «поверхностной» (отношение количества эмбрионов к площади поверхности), а также «линейной» (отношение количества эмбрионов к длине икряного шнура) плотности. Показано, что любое дополнительное воздействие на эмбрионы со стороны экспериментатора, связанное с удалением погибших особей, проводимое в процессе проведения экспериментов, может оказывать существенное влияние на результат, поэтому такие воздействия следует свести к минимуму.

Ключевые слова: *серая жаба, Bufo bufo, эмбриональное развитие, экспериментальные методы исследований, плотность икры, влияние температуры развития*

Амфибии широко используются в качестве модельных объектов в экологии, физиологии и биологии развития. Они сильно зависят от внешних условий — по сравнению, например, с млекопитающими — и поэтому являются хорошими индикаторами состояния окружающей среды. В настоящее время уделяется большое внимание использованию амфибий в качестве объекта биоиндикации и мониторинга состояния экосистем [1, 2], так как они широко рас-

пространены, на разных этапах онтогенеза являются то фито-, то зоофагами, легко доступны для изучения, биология большинства этих видов хорошо изучена, они многоплодны и сравнительно быстро воспроизводятся.

Серая жаба *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) является удобным модельным объектом для решения различных экспериментальных задач. Данный вид широко распространен от Западной Европы до Восточной Сибири [3]. Численность

на большей части ареала достаточно велика, т.е. одним из достоинств данного объекта исследований является доступность и легкость в сборе материала. Эмбриональные и личиночные стадии серой жабы легко изучать как в природных, так и в лабораторных условиях, большой размер кладки позволяет получать достаточное количество генетически однородного материала для проведения различных экспериментов. В настоящее время это один из самых изучаемых видов амфибий в Европе. Эмбриональные и личиночные стадии развития данного вида часто используют для целей биотестирования и биоиндикации [4–7]. Однако при постановке экспериментальных исследований по исследованию ранних стадий развития серой жабы часто не учитывают особенности биологии, характерные для данного вида. Структура кладки в сочетании с экологией икрометания накладывает определенные ограничения на проведение экспериментов с икрой амфибий в лабораторных условиях. Методику, разработанную для проведения лабораторных исследований на эмбриональных стадиях развития одного вида амфибий, невозможно без модификаций использовать при исследовании другого вида. Для проведения экспериментов по влиянию различных факторов на развитие амфибий требуется установить, как особенности биологии вида влияют на результаты проводимых экспериментов и каким образом можно минимизировать эти воздействия в процессе проведения исследования.

Кладка серой жабы представляет собой парный тяж общей длиной до десяти метров. Икра откладывается в виде шнуров, в которых содержится от 1002 до 6840 икринок, расположенных по спирали двумя рядами [3] (рис. 1А). В процессе икрометания самка жабы натягивает икриную шнур между стеблями водной растительности или различными подводными предметами. Скопления икры у серой жабы создаются за счет различной укладки икриных шнуров, переплетения и наматывания одних поверх других. Ранее мною было показано, что оптимальными условиями развития для икры серой жабы является натянутый икриную шнур, в котором наблюдаются низкая смертность, а также высокие темпы и высокая синхронность развития отдельных эмбрионов. В свернутом икриную шнуре наблюдается повышенная смертность примерно у трети всех исследованных кладок по сравнению с распрямленным икриную шнуром [8].

Кладка, например, другого широко распространенного модельного объекта — травяной лягушки *Rana temporaria* (Linnaeus, 1758) имеет

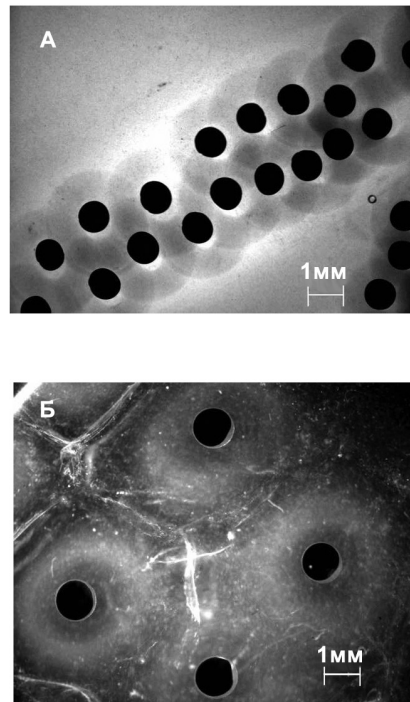


Рис.1. Расположение икринок в кладке. А — серая жаба, Б — травяная лягушка.

типичную для всех лягушек форму комка, образующегося благодаря склеиванию слизистых лицевых оболочек и содержащего от 282 до 4300 икринок [3] (рис. 1Б). После набухания икринной комочек всплывает и распределяется в толще воды, слизистые оболочки икринок слипаются друг с другом в местах соприкосновения, в других местах между ними остаются каналы, через которые кислород проникает к каждому из развивающихся зародышей. Таким образом, влияние плотности на развитие эмбрионов у травяной лягушки и серой жабы обусловлены разными особенностями структуры кладки этих видов.

Кроме того, плотные скопления икры у некоторых видов лягушек имеют адаптивное значение. Например, *R. temporaria* проводит икрометание ранней весной и откладывает икру в холодную воду, а в скоплениях икры температура на несколько градусов выше, чем в окружающей среде, и суточные колебания температуры менее выражены [3]. В пределах одного региона серая жаба мечет икру значительно позже, чем травяная лягушка [9], в уже теплую воду: икрометание начинается, когда вода в пруду прогревается до 6–14°C [10]. Особи же *R. temporaria* появляются в водоемах еще до их полного освобождения ото льда, когда температура воды составляет всего 3–4°C [3]. Поэтому икра серой жабы, в отличие от икры травяной лягушки, не нуждается в студенистом комке для прогревания. Таким образом, температурная толерантность этих видов также может быть различна.

Следовательно, методику, разработанную для проведения лабораторных исследований на одних видах (например, на икре лягушки), нельзя распространять на исследования эмбриональных стадий развития других видов (например, серой жабы). Таким образом, для исполь-

зования в лабораторных исследованиях икры серой жабы целесообразно оптимизировать методику проведения экспериментов с учетом особенностей биологии вида.

Материалы и методы

Икра для экспериментов была получена естественным путем в лабораторных условиях от производителей, отловленных в состоянии амplexуса в период массового икрометания в трех водоемах Московской области: Стерляжий пруд (Звенигородская биостанция МГУ имени С.Н. Скадовского), верховое болото Шарাপовского лесничества Звенигородского лесхоза (Одинцовский район) и озеро Глубокое, являющееся эталоном природного объекта по чистоте воды (Рузский район). Пары производителей помещались в отдельные аквариумы размером 42×30×22 см и полезным объемом 21 л, в которых создавались условия, максимально приближенные к природным, для откладки икры. Для каждого эксперимента использовались зародыши, полученные от одной пары производителей, т.е. являющиеся полными сибсами, что существенно снижало вклад генетической компоненты изменчивости. Сразу после завершения процесса икрометания полученная икра рассаживалась по экспериментальным аквариумам. Для рассадки выбирались участки кладки, не имеющие видимых деформаций, что существенно снижало случайный вклад поврежденных эмбрионов и неоплодотворенных яйцеклеток в результирующую смертность. Все эксперименты на эмбрионах проводились от момента окончания икрометания, который принимался за нулевой, до момента вылупления личинок.

Была поставлена серия экспериментов по выявлению влияния особенностей биологии вида *B. bufo* (таких как структура кладки, экология икрометания, плотность эмбрионов и оптимальная температура развития [8, 11–13]) и ряда лабораторных факторов (например, геометрия аквариума или воздействие экспериментатора) на результаты исследований на эмбриональных стадиях развития. Для этого были проведены следующие эксперименты:

1. Оптимизация объема выборки путем проведения измерений через равные промежутки времени. Было проведено исследование с определением оптимального интервала проведения измерений.

2. Подбор объема воды, необходимого для оптимального развития эмбрионов. Поскольку развитие амфибий происходит в водной среде, для проведения лабораторных исследований важно выявить необходимый и достаточный

объем воды, а также оптимальную геометрию аквариума.

3. Исследование влияния экспериментатора при удалении погибших эмбрионов, а также при замене воды в аквариумах [11].

Оценка стадий развития проводилась с помощью таблиц нормального развития для серой жабы [14]. Для сравнения между собой темпов развития в различных экспериментах был использован показатель «индекс уровня развития» [9, 14], который оценивается по формуле:

$$X(t) = \frac{\sum_{i=1}^J (K(i) \cdot n(i))}{M(t)},$$

где $X(t)$ — индекс уровня развития эмбрионов в одном аквариуме в момент времени t ; $M(t)$ — общее количество выживших икринок в момент времени t ; J — количество выделенных стадий развития [14]; $n(i)$ — количество эмбрионов, находящихся на стадии развития i в момент времени t ; $K(i)$ — условный коэффициент, присвоенный каждой стадии развития (дробление — 0, гаструла — 1 и т.д.; вылупление — 6). Условный коэффициент $K(i)$ присваивался таким стадиям развития, которые можно отличить на глаз от предыдущих стадий без использования микроскопа [15]. Таким образом, данный показатель учитывает разброс по стадиям развития и количеству особей на каждой из стадий в определенный момент времени относительно общего количества выживших эмбрионов.

Результаты экспериментов на икре серой жабы были обработаны с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Company, США). Для оценки достоверности различий между выборками использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни; различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для сравнения между собой трех и более выборок применялся непараметрический критерий Краскела-Уоллиса, который является обобщением критерия Манна-Уитни для случая трех и более выборок.

Результаты и обсуждение

В результате многолетнего изучения воздействия ряда факторов на эмбриональное развитие *B. bufo* в экспериментальных условиях были выявлены параметры, которые могут оказывать влияние на результаты лабораторных исследований. Эти факторы связаны как с особенностями биологии самого исследуемого вида, так и с эффектом используемого оборудования и влиянием экспериментатора. Рассмотрим воздействие исследованных факторов более подробно.

Влияние температуры. Температура окружающей среды является одним из наиболее важных факторов, влияющих на рост и развитие амфибий. Существует прямая зависимость между температурой и скоростью эмбрионального развития [16]. Чаще всего исследования в лабораторных условиях проводятся при температуре 19–20°C [14, 17]. В природных же условиях эмбрионы амфибий нормально развиваются при температуре около 15°C [18]. В результате проведенных экспериментов показано, что температура оказывает существенное влияние на тем-

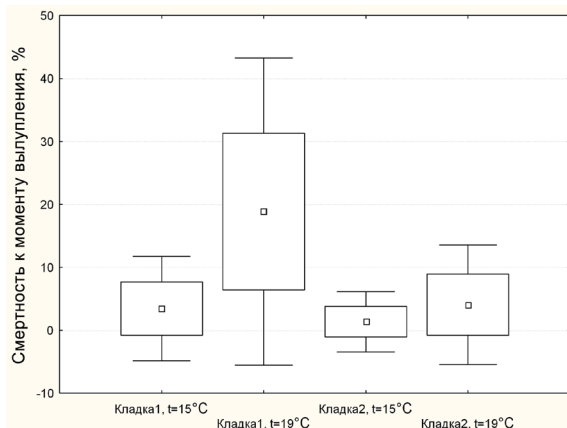


Рис. 2. Смертность (среднее значение $\pm$ ошибка среднего $\pm$ интервал 1,96 ошибки среднего) к моменту вылупления в двух кладках *Bufo bufo* в зависимости от температуры, при которой развиваются эмбрионы.

пы развития и смертность эмбрионов серой жабы [13]. Скорость эмбриогенеза серой жабы при температуре 19°C увеличивается почти в 1,4 раза по сравнению со скоростью развития при температуре 15°C: при 19°C время развития от момента оплодотворения до момента вылупления составляет примерно 95 ч, тогда как при 15°C – 130 ч. Кроме того, при более высокой температуре (19°C) в кладках с пониженной выживаемостью увеличивается и эмбриональная смертность к моменту вылупления (рис. 2) [13]. Следовательно, температура также оказывает некоторое влияние и на смертность эмбрионов серой жабы, но это влияние тесно связано со свойствами самой кладки. Таким образом, при проведении экспериментов в лабораторных условиях рекомендуется работать при пониженной температуре (15°C), близкой к природным условиям [18].

Влияние плотности и структуры кладки. Влияние плотности оценивают обычно по соотношению количества икринок и объема воды, в котором они развиваются. Возможно, это справедливо для лягушек: они откладывают икру в виде отдельных икринок, которые иногда слипаются в шарообразную или пастообразную

массу. Кладка серой жабы представляет собой протяженные тяжи до нескольких метров длиной, различным образом распределенные в водоеме. Таким образом, различия в проявлении влияния плотности икры на развитие эмбрионов у травяной лягушки и серой жабы обусловлены разными особенностями структуры кладки этих видов (рис. 1). В результате многолетних исследований на эмбрионах серой жабы были выявлены различные типы плотности развивающейся икры серой жабы: «поверхностная», «объемная», «линейная» и плотность, заданная укладкой икринного шнура [8]. «Поверхностная» плотность – это количество икринок на единицу площади поверхности (дно аквариума). «Объемная» плотность – это отношение количества икринок к объему воды, в котором они развиваются. «Линейная» плотность – это отношение количества икринок к длине шнура, на которую он растянут. Также было показано, что поверхностная и линейная плотности, в отличие от объемной плотности, оказывают существенное влияние на темпы развития и смертность эмбрионов [8]. Оптимальным для развития икринок серой жабы является натянутый икринный шнур.

Кроме того, было выявлено два вида зависимости выживаемости эмбрионов от поверхностной плотности: монотонная (с увеличением плотности увеличивается и эмбриональная смертность) и немонотонная (возникает второй максимум выживаемости эмбрионов при высокой поверхностной плотности) (рис. 3) [8, 11–12]. Второй вид зависимости наблюдается в кладках, в которых смертность эмбрионов достаточно высока, т.е. общая жизнеспособность кладки ниже, чем в кладках с монотонной зависимостью смертности от плотности. В двух из трех исследованных водоемов наблюдались оба типа реакции на повышение плотности. Однако во всех кладках, полученных от производителей, отловленных на озере Глубокое, обнаружен только один вид зависимости выживаемости эмбрионов от поверхностной плотности – монотонный. Следует отметить, что во всех исследованных кладках из этого озера выживаемость была достаточно высокой (выше 90%), что характерно для кладок с монотонной реакцией смертности на повышение плотности развивающихся эмбрионов.

Таким образом, при постановке экспериментов в лабораторных условиях необходимо учитывать особенности реакции на плотность, которые могут возникать в популяциях, из которых берется материал для исследований. Следовательно, необходимо проводить каждое тестирование в условиях разной плотности

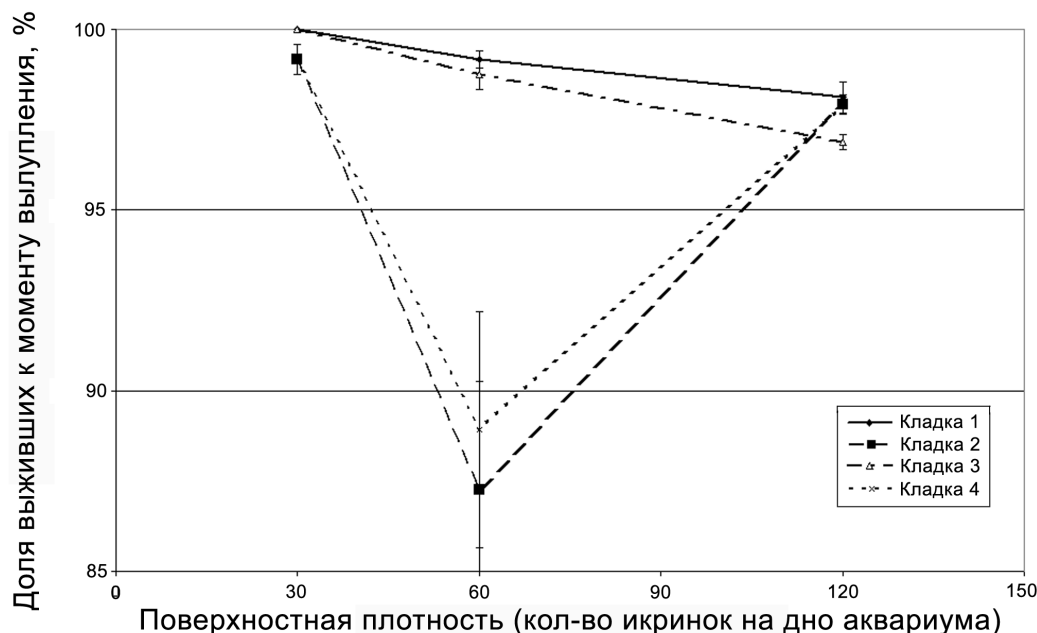


Рис. 3. Пример двух видов зависимости выживаемости эмбрионов *Bufo bufo* от поверхностной плотности к моменту вылупления по результатам исследований 2011 г. Кладки 1 и 3 — зависимость монотонная, т.е. с увеличением плотности увеличивается и эмбриональная смертность. Кладки 2 и 4 — зависимость немонотонная, т.е. возникает второй максимум выживаемости эмбрионов при высокой поверхностной плотности.

эмбрионов (рекомендуется — 30 и 120 икринок на стандартный аквариум [8, 12]) для получения наиболее полных данных по влиянию исследуемого фактора на эмбриональные стадии развития данного вида.

Оценка объема выборки и интервала времени проведения измерений. Для решения вопроса о минимальном объеме выборки и необходимом количестве повторностей эксперимента необходимо учитывать следующее. Объем выборки не может быть слишком большим из-за ограниченности исследования по времени, в средствах и числе исполнителей, но и не должен быть слишком маленьким в силу статистических и биологических соображений. Был применен метод систематической случайной выборки, при котором сначала случайным образом проводится первое измерение, а затем измерения проводятся через определенные интервалы (например, взятие образцов через равные расстояния в пространстве или проведение измерений через равные промежутки времени) [19]. Систематический отбор выборки, при котором выборка формируется неслучайными методами (например, через равные промежутки времени), не увеличивает систематическую ошибку, но существенно снижает объем выборки, необходимый для достижения нужного уровня точности проводимых исследований. Таким образом, мы можем поставить меньшее количество повторно-

стей одного эксперимента для достижения оптимального уровня репрезентативности выборки.

Для оптимизации объема выборки путем проведения измерений через равные промежутки времени была поставлена серия экспериментов. Икра помещалась в стандартные аквариумы по 30, 120 и 480 икринок. За начальную точку отсчета принимался момент завершения икрометания серой жабы. Количество умерших икринок и стадия развития фиксировались в одной серии экспериментов каждые 24 ч, в другой — через каждые 12 ч, в третьей — через каждые 8 ч. Также

была проведена серия экспериментов с интервалами между проведением измерений 6, 8 и 10 ч.

В результате работы по оптимизации объема выборки путем проведения измерений через равные промежутки времени было показано, что оптимальными являются 8-часовые интервалы. При температуре 15°C время развития от момента завершения икрометания, который принимался за нулевой, до момента вылупления составило примерно 130 ч [13]. При большем интервале проведения измерений (12 или 24 ч) есть опасность пропустить ключевые стадии развития. При интервале проведения измерений 24 ч мы вообще пропускаем ключевые стадии развития с момента образования нервной трубки и до момента вылупления, а также саму стадию вылупления (проведение последнего измерения происходит примерно на 140-й ч с начала эксперимента). Детализация динамики смертности от стадии формирования нервной пластины II(9) до стадии вылупления III(2) [14], когда на смертность и развитие эмбрионов начинает оказывать влияния средовая компонента, также явно недостаточна при интервалах проведения измерений 12 и 24 ч.

При изменении интервала времени между измерениями от 6 до 8 или 10 ч детализация результатов эксперимента существенно не изменяется. Проводить подсчет количества умерших

эмбрионов и определять индекс уровня развития удобнее либо через 8, либо через 6 ч. Тогда можно спланировать время проведения измерений в течение суток, что существенно облегчает работу. Однако эксперимент с меньшим интервалом проведения измерений (через каждые 6 ч) показал, что повышения уровня детализации не происходит. Кроме того, сокращение интервала существенно затрудняет работу, так как эксперимент длится в течение нескольких суток. При этом увеличивается утомляемость экспериментатора, что может привести к снижению точности проводимых измерений. При 10-часовом интервале проведение измерений будет сдвигаться по времени в течение суток, что существенно затрудняет планирование эксперимента. Таким образом, оптимальным интервалом проведения измерений был выбран 8-часовой.

Исследование объема воды, необходимого для проведения экспериментов. Для эксперимента использовались стандартные аквариумы с площадью дна 44 см² и высотой столба воды 3 см (объем воды в аквариуме 0,13 л), 6 см (объем воды в аквариуме 0,27 л), а также 12 см (объем воды в аквариуме 0,53 л). Кроме того, был поставлен эксперимент в аквариумах с площадью дна 56,75 см² и 113,10 см² и высотой столба воды 3 см (объем воды — 0,17 л и 0,34 л соответственно). Таким образом, изменение объема воды в данных экспериментах задавалось с помощью изменения геометрии аквариумов. В результате серии экспериментов (одинаковая площадь дна аквариума, но разная высота столба воды), проводимой при плотности посадки 30 и 120 икринок на аквариум, было показано, что при объемах воды от 0,1 л до 0,5 л выживаемость эмбрионов серой жабы достоверно не различается. Результаты непараметрического теста Краскела-Уоллиса показывают отсутствие различий между исследуемыми группами (плотность 30: $H(2, n=12)=2,44, p=0,2946$; плотность 120: $H(2, n=12)=2,63, p=0,27$). Динамика смертности при разном объеме воды также не различается при любой плотности посадки (30 или 120 икринок на аквариум). Темпы развития эмбрионов (индекс уровня развития) в условиях данного эксперимента также не зависят от объема воды при плотности как 30, так и 120 икринок на аквариум. Критерий Краскела-Уоллиса также показывает отсутствие значимых различий между исследуемыми группами при плотности как 30 ($H(2, n=12)=4,563830, p=0,1021$), так и 120 ($H(2, n=2)=1,884615, p=0,3897$) икринок на аквариум.

В следующей серии экспериментов при одинаковой величине столба воды (3 см), но

разной площади поверхности дна (57 и 113 см² соответственно) смертность эмбрионов составила $2,71 \pm 1,50$ в первом случае и $1,67 \pm 0,59$ — во втором. Согласно критерию Манна-Уитни достоверных различий нет (U-критерий=7,00, $z=0,289, p=0,773$). По индексу уровня развития согласно критерию Манна-Уитни также нет достоверных различий (U-критерий=3,00, $z=1,440, p=0,149$).

Результаты этих экспериментов позволили выяснить, какой объем воды необходим и достаточен для нормального развития эмбрионов серой жабы. Показано, что изменение геометрии аквариума в пределах исследованных объемов воды не оказывает воздействия на результаты проводимых опытов. Однако для стандартизации условий проведения исследований в дальнейших экспериментах было решено принять за стандартный аквариум с площадью дна 44 см² и высотой столба воды 3 см (объем воды — примерно 0,13 л).

Влияние экспериментатора на результаты исследований. На результаты лабораторных исследований могут оказывать влияние причины, связанные с ошибками экспериментатора. В опытах по оценке влияния таких факторов на развитие и смертность одиночно развивающихся эмбрионов было показано, что самая высокая смертность наблюдается в опыте, в котором проводилась замена воды на аналогичный объем из аквариума, содержащего фрагмент развивающейся кладки серой жабы, самая низкая — в контроле, который развивался без дополнительных воздействий. Таким образом, самыми комфортными были признаны условия у эмбрионов, развивающихся без всякого воздействия со стороны исследователя [11].

Часто в процессе проведения экспериментов на эмбриональных и личиночных стадиях развития производят не только замену воды, но и удаление погибших особей [1, 2, 17]. При изъятии умерших головастиков или эмбрионов, которые развиваются независимо друг от друга (отдельные икринки, не имеющие общей оболочки), такое вмешательство может не оказывать существенного влияния на результат исследования, так как при этом происходит лишь перемешивание воды. При извлечении же погибших эмбрионов, которые развиваются в едином икринном шнуре, экспериментатору приходится нарушать целостность структуры кладки, разрушать единую защитную оболочку. В ходе проведения экспериментов показано, что такие действия приводят к увеличению смертности вместо ожидавшегося положительного эффекта [11].

Таким образом, любое дополнительное воз-

действие, связанное с удалением погибших особей, проводимое в процессе проведения лабораторных исследований, может оказывать существенное негативное влияние на результаты экспериментов.

Рекомендации по экспериментальному исследованию раннего развития серой жабы. На основе анализа литературных данных и результатов моих исследований показано, что особенности биологии вида (структура кладки, особенности икрометания, температура развития) оказывают влияние на результаты лабораторных экспериментов. Также в работе выявлены лабораторные факторы, которые должны учитываться при постановке опытов. На основе полученных данных разработаны рекомендации для проведения лабораторных исследований на эмбриональных стадиях развития серой жабы с учетом особенностей этого вида. Стандартизировать условия можно при соблюдении следующих условий:

- На протяжении всего эксперимента нужно поддерживать температуру на уровне 15–17°C;

- При постановке экспериментов следует учитывать влияние не только «объемной», но и «поверхностной», а также «линейной» плотности;

- Желательно выполнять регулярные измерения через одинаковые промежутки времени (8 ч), проводить каждое тестирование при двух значениях начальной плотности эмбрионов; рекомендуемые — 30 и 120 икринок в едином шнуре на стандартный аквариум с площадью дна 44 см² и высотой столба воды 3 см (объем воды в аквариуме 0,13 л);

- Избегать любых дополнительных воздействий на эмбрионы со стороны экспериментатора, связанных с удалением погибших особей, т.к. это может оказывать существенное влияние на результат.

Работа выполнена в рамках темы госрегистрации (№ АААА-А16-116021660031-5). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Автор заявляет, что у нее нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dawson D.A., McCormick C.A., Bantle J.A. Detection of teratogenic substances in acidic mine water samples using the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX) // J. Appl. Toxicol. 1985. Vol. 5. N 4. P. 233–244.
2. Herkovits J., Pérez-Coll C.S., Herkovits F.D. Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX) // Environ. Pollut. 2002. Vol. 116. N 1. P. 177–183.
3. Кузьмин С.Л. Земноводные бывшего СССР. М.: Т-во научных изданий КМК, 2012. 370 с.
4. Amicarelli F., Colafarina S., Cesare P., Aimola P., Di Ilio C., Miranda M., Ragnelli A.M. Morphofunctional mitochondrial response to methylglyoxal toxicity in *Bufo bufo* embryos // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2001. Vol. 33. N 11. P. 1129–1139.
5. Mandrillon A.L., Saglio P. Herbicide exposure affects the chemical recognition of a non native predator in common toad tadpoles (*Bufo bufo*) // Chemoecology. 2007. Vol. 17. N 1. P. 31–36.
6. Bernabo I., Brunelli E., Berg C., Bonacci A., Tripepi S. Endosulfan acute toxicity in *Bufo bufo* gills: Ultrastructural changes and nitric oxide synthase localization // Aquat. Toxicol. 2008. Vol. 86. N 3. P. 447–456.
7. Bernabo I., Bonaccia A., Coscarelli F., Tripepi M., Brunelli E. Effects of salinity stress on *Bufo balearicus* and *Bufo bufo* tadpoles: Tolerance, morphological gill alterations and Na⁺/K⁺-ATPase localization // Aquat. Toxicol. 2013. Vol. 132–133. P. 119–133.
8. Дмитриева Е.В. Влияние структуры кладки серой жабы (*Bufo bufo*) на эмбриональное развитие // Зоол. журн. 2013. Т. 92. № 12. С. 1437–1449.
9. Cooke A.S. Spawn site selection and colony size of the frog (*Rana temporaria*) and the toad (*Bufo bufo*) // J. Zool. 1975. Vol. 175. P. 29–38.
10. Drobenkov S.M., Novitsky R.V., Kosova L.V., Ryzhevich K.K., Pikulik M.M. The amphibians of the Belarus. Advances in amphibian research in the former Soviet Union, vol. 10. Sofia-Moscow: Pensoft, 2006. 168 p.
11. Dmitrieva E. The effects of density on mortality and development of the *Bufo bufo* eggs and tadpoles // Herpetologia Petropolitana / Eds. N. Ananjeva and O. Tsinenko. St. Petersburg, 2005. P. 130–133.
12. Дмитриева Е.В. Влияние плотности икры на темпы развития и смертность серой жабы (*Bufo bufo*) в лабораторных условиях // Зоол. журн. 2007. Т. 86. № 2. С. 229–235.
13. Dmitrieva E.V. Experimental study of the temperature effect on survival and development rates in the early ontogenesis of common toad (*Bufo bufo*) // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N. 2. P. 71–73.

14. *Cambar R., Gipouloux J.* Table chronologique du development embryonnaire et larvaire du crapaud commun *Bufo bufo* L. // Bull. Biol. Fr. Belg. 1956. Vol. 90. P. 198–217.

15. *Dmitrieva E.V.* Influence of the concentration of dissolved oxygen on embryonic development of the common toad (*Bufo bufo*) // Russ. J. Dev. Biol. 2015. Vol. 46. N. 6. P. 368–380.

16. *Moore J.A.* Temperature tolerance and rates of development in the eggs of amphibia // Ecology. 1939. Vol. 20. N. 4. P. 459–478.

17. *Дабаян Н.В., Слепцова Л.А.* Травяная ля-

гушка *Rana temporaria* L. // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 442–462.

18. *Bachmann K.* Temperature adaptations of amphibian embryos // Am. Nat. 1969. Vol. 103. N 930. P. 115–130.

19. *Hayek L.-A.* Research design for quantitative amphibian studies // Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians / Eds. W.R. Heyer, M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.-A.C. Hayek, and M.S. Foster / Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1994. P. 21–38.

Поступила в редакцию 31.01.2019 г.

После доработки 19.06.2019 г.

Принята в печать 17.07.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

EXPERIMENTAL STUDY OF THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF COMMON TOAD (*BUFO BUFO*): METHODOLOGICAL ASPECTS

E.V. Dmitrieva

Department of Evolutionary Biology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: dmitrieva@aport.ru

Embryos and larvae of many amphibian species are widely used as experimental models in the areas of developmental biology, toxicology and fundamental medicine. However, there are almost no experimental approaches considering the biology of particular species. Moreover, experimental conditions are not standardized between different laboratories, and there are no examples of making efforts to minimize an influence of the researcher's personality on the results of experiments. The worse thing is that many experimental methods designed for particular species are applied for other amphibians without an adaptation. In the presented paper, the results of long-term experimental investigations of environmental factors influencing embryonic development of the common toad *Bufo bufo* are summarized. These investigations are an example of establishing the methods and approaches considering the species biology, allowing minimizing heterogeneity of an influence of stochastic factors and standardizing experimental conditions. For this species, it is recommended to maintain the temperature at 15°C in the course of all experiments, to perform all measurements with 8 hr intervals, and to perform each test in at least two replicas, which differ in the initial density of embryos (clutch fragments containing 30 or 120 embryos per standardized aquarium). When designing experiments, it is suggested to consider not only volumetric density of embryos (the number of embryos per unit of volume), but also their surface density (the number per unit of area) and linear density (the number per unit of roe cord length). It was experimentally shown that it is necessary to keep the interactions between the researcher and the object at a minimal level, as all kinds of researcher actions, including removal of death embryos, severely affect the results of experiments.

Keywords: *common toad, Bufo bufo, embryonic development, experimental research method, egg density, effect of temperature on development*

Сведения об авторах

Дмитриева Елена Владимировна — канд. биол. наук, ст. инженер кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-01; e-mail: *dmitrieva@aport.ru*

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 581.55

КОНКУРЕНТНАЯ СТРАТЕГИЯ РАСТЕНИЙ СУБАЛЬПИЙСКОГО ВЫСОКОТРАВЬЯ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО КAVKAZA

**К.В. Дудова^{1,*}, Т.М. Джатдоева², С.В. Дудов¹, А.А. Ахметжанова¹, Д.К. Текеев³,
В.Г. Онипченко^{1,3}**

¹Кафедра геоботаники, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12;

²«Технологический колледж» Карачаево-Черкесской республики, Россия, 369000, г. Черкесск, ул. Свободы, д. 62А;

³Тебердинский государственный природный биосферный заповедник, Россия, г. Теберда, 369210, Бадукский пер., д.1

*e-mail: k.v.dudova@yandex.ru

С помощью измерений функциональных признаков листьев исследовали спектр экологических (CSR) стратегий для сообществ высокотравных субальпийских лугов Северо-Западного Кавказа (Тебердинский заповедник). Эти сообщества развиваются во влажных западинах, долинах рек и ложбинах стока в субальпийском высоком поясе и являются характерным элементом растительности Кавказа. Доминантами выступают крупнотравные виды, такие как *Rumex alpinus*, *Senecio platyphylloides*, *Cephalaria gigantea*, *Ligusticum alatum* и др. Для оценки экологических стратегий растений измеряли три функциональных признака: площадь листа, массы водонасыщенного и сухого листа. На их основе рассчитывали необходимые показатели для 42 видов сосудистых растений. Большинство растений субальпийского высокотравья имеют черты конкурентной и конкурентно-рудеральной стратегий. 11 видов отнесены алгоритмом к конкурентной стратегии (например, *Angelica purpurascens*, *A. tatianae*, *Cirsium chlorocomos*, *Heracleum asperum*, *H. leskovii*, *H. sosnowskyi* и др.). Конкурентно-рудеральная (CR) стратегия выявлена для *Aconitum nasutum*, *Cirsium simplex*, *Geranium sylvaticum*, *Hesperis voronovii*, *Rumex alpestris* и др. Два вида (*Achillea millefolium*, *Dactylis glomerata*) отнесены к CS-стратегии. Стресс-толерантная стратегия выявлена лишь для трех видов: *Veronica filiformis*, *Lilium monadelphum*, *Millium effusum*. Смешанная CSR-стратегия показана для двух видов (*Trifolium pratense*, *Astrantia maxima*). Большинство (93%) изученных видов имеют ярко выраженные черты конкурентности. При этом процентный вклад черт этой стратегии положительно коррелирует со средней вегетативной высотой вида. Значительное число изученных видов также имеет черты рудеральной экологической стратегии (в среднем, 26%). Мы предполагаем, что это результат использования высокогорных фитоценозов этого региона под пастбища в течение многих столетий. Полученные нами результаты вступают в некоторое противоречие с распространенной точкой зрения, что в высокогорьях преобладают стресс-толерантные виды. Это можно объяснить тем, что изученные луга занимают наиболее благоприятные местообитания в высокогорьях, в которых конкурентные преимущества имеют быстрорастущие крупнотравные виды. Нами подтверждена гипотеза о том, что константные виды субальпийского высокотравья Северо-Западного Кавказа имеют значительно (до 95%) выраженные черты конкурентной стратегии (за исключением *V. filiformis*).

Ключевые слова: функциональные признаки, CSR-стратегии, экологические стратегии, высокотравье, субальпийские луга, высота растения, Тебердинский заповедник

Низкие температуры являются основным фактором экологического стресса в высокогорьях, который препятствует произрастанию древесных растений [1]. Поэтому для растений вы-

сокогорий наиболее характерной считается стресс-толерантная стратегия по сравнению с растениями других областей [2–6] (хотя анализ стратегий растений холодных биомов показывает также значительную роль рудеральности [7]). Однако мы предположили, что в наиболее благоприятных условиях субальпийского пояса Кавказа растения лугового высокотравья обладают хорошо выраженными чертами конкурентной стратегии.

Высокотравье — характерный элемент высокогорной растительности Кавказа [8]. Высокотравные сообщества развиваются в долинах рек, в западинах, а также по склонам малой крутизны субальпийского пояса на высотах от 1800 до 2600 м над уровнем моря. Поступление элементов минерального питания за счет выноса вещества из верхних поясов во время снеготаяния и лавин обуславливает достаточное увлажнение и высокую доступность элементов минерального питания [8]. В этих травяных растительных сообществах доминируют крупнолистные, часто корневищные, травы, т.н. «высокотравье» [9]. В первую очередь это — виды родов *Heracleum*, *Angelica*, *Ligusticum*, *Chaerophyllum*, *Senecio*, *Campanula*, а также *Anthriscus silvestris*, *Telekia speciosa* и др. [8]. В рамках эколого-флористической классификации данные сообщества относятся к союзу субальпийских лугов *Rumicetum alpini* [10]. На Северо-Западном Кавказе представлены высокотравные сообщества, относящиеся к двум ассоциациям: для *Anthriscus silvestris*—*Rumicetum alpini* отмечено 69 видов сосудистых растений, а для *Cephalario giganteae*—*Ligusticetum alani* — 77 видов. При каких-либо нарушениях в этих фитоценозах часто развиваются различные типы вторичного (рудерального) высокотравья с участием *Rumex alpinus*, *Veratrum album* и др. [11].

Общее проективное покрытие высокотравных лугов достигает 100%, а средняя высота полога составляет не менее 30 см [12]. Несмотря на значительное проективное покрытие высокотравья, основной вклад в видовое разнообразие лугов вносят более низкие виды под его пологом [8]. В связи с этим сосуществование высоких крупнолистных видов с более низкими, произрастающими под их пологом, позволяет поставить вопрос о механизмах их взаимодействия между собой и стратегиях существования каждого внутри сообщества. Один из возможных путей описания поведения отдельных видов в сообществе — это определение их экологических стратегий [13].

Ф. Грайм [13–15] разработал теорию, получившую в экологии растений наиболее широкое распространение. Выделение стратегий проис-

ходит на основании сочетания двух факторов, которые автор полагает основными в организации растительности: стресс и нарушения. Конкуренты (С) развиваются в условиях со слабым стрессом и слабыми нарушениями, стресс-толеранты (S) — в условиях сильного стресса и слабого нарушения, а рудералы (R) — в условиях сильных нарушений [2, 14]. Эти стратегии, которые включают наиболее фундаментальные особенности организма (потребление ресурсов, рост, размножение), называются базовыми [15]. Для визуализации результатов предложена схема «треугольника Грайма», где в углах треугольника располагаются первичные типы стратегий [13]. При этом теория разработана для взрослых, сформированных, особей растений [15].

Начиная с конца XX века, предпринимались неоднократные попытки определения стратегий как набора особых генетически закрепленных признаков. Наиболее успешным в этой области оказался — функциональный подход, в рамках которого было предложено использовать для определения типа стратегии видов растений значения их функциональных признаков [16].

В настоящее время это направление активно развивается в системе представлений о стратегиях Грайма, который определяет их как «группы сходных или аналогичных, генетически определенных признаков, которые часто повторяются среди видов или популяций растений и обуславливают их сходство в механизмах адаптации к условиям окружающей среды» [13, 14]. Функциональные признаки — это морфологические, физиологические и фенологические признаки, которые косвенно влияют на приспособленность растений через их основные функции: рост, размножение и выживание [17]. Возможность применения функциональных признаков для выявления типов стратегий на настоящий момент показана для широкого спектра видов [18]. Первоначально CSR-ординация была основана на исследовании высоты полога, максимальной относительной скорости роста и др. [13]. В дальнейшем для ординации использовались и другие наборы признаков [2]. Пирс с соавт. [19, 20] разработали метод выделения стратегий на основе данных по удельной листовой поверхности (SLA, specific leaf area) и доле сухого вещества листа (LDMC, leaf dry matter content). Эти признаки определяют две основные оси варьирования признаков при ординации: «экономического спектра» листа (LES, leaf economics spectrum) и размеров растения. Эти оси в основном определяют положение видов в пространстве треугольной CSR-ординации. «Экономический спектр»

отражает соотношение между вкладом ресурсов в их дальнейшее использование и запасание. Виды конкурентной стратегии имеют большую площадь листьев, рудеральной — высокое содержание воды в живых листьях и соответственно низкое содержание сухого органического вещества, стресс-толеранты — мелкие листья с низким содержанием воды [18, 19].

Преимущество функционального подхода к изучению стратегий — это в первую очередь возможность его единовременного применения к большому числу видов и особей внутри сообщества [19]. Несмотря на активное развитие направления за рубежом, для нашей страны такие исследования единичны и покрывают незначительную часть территории России. Исследования стратегий растений высокогорий нашей страны с позиций функциональных признаков практически не проводились.

Целью настоящего исследования является оценка спектра экологических стратегий видов сосудистых растений субальпийских высокогорных лугов Кавказа и проверка гипотезы о том, что у этих видов наиболее выражена конкурентная стратегия.

Материалы и методы

Сбор полевого материала проводили с 2014 по 2018 гг. в летние месяцы на территории Тебердинского государственного биосферного заповедника (Карачаево-Черкесская республика, Россия).

Исследовали сообщества субальпийских высокогорных лугов на абсолютных высотах от 1800 до 2400 м над уровнем моря. Доминантами изученных лугов выступают крупнотравные виды, такие как *Rumex alpinus*, *Senecio platyphylloides*, *Cephalaria gigantea*, *Ligusticum alatum* и др. [8].

По итогам анализа имеющейся базы данных геоботанических описаний [8], включающей 40 описаний высокогорных сообществ, нами был выбран 41 вид сосудистых растений. Это:

- диагностические виды класса (*Mulgedio-Aconitetea* Hadač et Klika in Klika et Hadač 1944), союза (*Rumicion alpini* Rubel ex Klika in Klika et Hadač 1944) и ассоциаций (*Anthriscio sylvestris-Rumicetum alpini* Onipchenko 2002, *Cephalario giganteae-Ligusticetum alani* Onipchenko 2002) с высокой встречаемостью [8];

- константные виды (присутствие более чем в 5 описаниях из 40 с баллами проективно-покрытия больше 1) [18];

- виды, которые известны как характерные для сообщества в литературных источниках (*Angelica tatiana*, *Heracleum sosnowskyi*, *Telekia speciosa*) [8].

Перечень изученных видов дан в таблице.

Для оценки экологических стратегий растений оценивали три функциональных признака листа: площадь, масса водонасыщенного листа и масса сухого листа, по которым рассчитывали необходимые показатели (таблица). Измерения проводили согласно международному протоколу измерений [16, 20].

Для каждого вида обычно собирали по 10 (редко 5) хорошо развитых, не поврежденных срединных листьев с разных растений в генеративном состоянии. После сбора их ставили в стакан с небольшим количеством воды, накрывали полиэтиленом и оставляли на ночь в холодильнике для насыщения листьев влагой. Затем водонасыщенные листья взвешивали на аналитических весах для измерения массы и сканировали для дальнейшего вычисления площади. После этого образцы сушили в отдельных пакетах при комнатной температуре 5–7 сут и затем — при температуре 80°C в сушильном шкафу до постоянного веса в течение 24 ч. Далее листья взвешивали повторно. Площадь листьев рассчитывали по сканированному изображению в программе GIMP 2.8.22.

Высоту растений измеряли как кратчайшее расстояние от почвы до верхних хорошо развитых листьев, исключая присоцветные [20]. Для каждого вида провели 25 измерений. Значения высоты в статье приводятся в миллиметрах с указанием стандартной ошибки среднего.

В основе определения стратегий лежит ординация функциональных признаков по методу главных компонент, которая позволяет выделить основные оси варьирования признаков [7]. Для вычисления степени выраженности трех базовых стратегий для каждого вида существует приложение StrateFu для MS Excel [7], которое мы использовали в настоящей работе. Полученные таким образом данные анализировали в этом пакете и R-пакетах *ggplot2* (построение графиков), *ggtern* (построение графиков-треугольников), *stats* (получение статистики выборок), *base* (базовые инструменты для работы в среде).

Номенклатура сосудистых растений приведена в соответствии со списком флоры Тебердинского заповедника [21].

Результаты

Из 41 проанализированного вида 11 имеют ярко-выраженную конкурентную стратегию, а остальные 28 характеризуются смешанными. Большинство растений субальпийского высокогорья имеет черты конкурентной и конкурентно-рудеральной стратегий (рис. 1, таблица). Многие изученные виды были отнесены авто-

Таблица

Значения функциональных признаков и выраженность экологических стратегий у видов субальпийских высокогорных лугов Кавказа

Вид	LA	LDW	LDMC	SLA	№	C	S	R	CSR	H
<i>Achillea millefolium</i>	2679	208	24	13	1	50	37	13	CS	25±0,8
<i>Aconitum nasutum</i>	2087	94	18	22	2	47	10	42	CR	49±0,2
<i>Aconitum orientale</i>	30017	1133	17	26	3	78	2	20	C	66±0,3
<i>Angelica purpurascens</i>	143854	5560	15	26	18	88	0	12	C	119±3,6
<i>Angelica tatianae</i>	378987	30600	20	12	19	93	4	3	C	84±3,6
<i>Astrantia maxima</i>	2041	85	29	24	4	30	40	30	CSR	13±0,6
<i>Asyneuma campanuloides</i>	1551	50	21	31	20	32	22	47	CSR	48±1,5
<i>Athyrium distentifolium</i>	14498	506	20	29	5	65	9	27	C	32±2,3
<i>Campanula lactiflora</i>	2124	81	21	26	21	38	21	41	CR	124±3,5
<i>Cephalaria gigantea</i>	18396	727	17	25	6	75	1	24	CR	101±3,2
<i>Cerastium davuricum</i>	1070	26	15	41	7	30	0	70	CR	25±1,4
<i>Chaerophyllum aureum</i>	17217	394	20	44	22	60	9	31	CR	52±2,9
<i>Cirsium chlorocomos</i>	17336	1786	21	10	23	85	15	0	C	98±6,2
<i>Cirsium obvallatum</i>	8898	380	11	23	24	70	0	30	CR	110±3,2
<i>Cirsium pugnax</i>	5898	448	17	13	25	81	4	15	CR	37±1,9
<i>Cirsium simplex</i>	1381	68	15	20	26	50	0	50	CR	19±1,3
<i>Dactylis glomerata</i>	3579	208	31	17	8	40	42	18	CS	66±3,6
<i>Delphinium schmalghausenii</i>	8102	500	25	16	27	58	27	15	C	58±1,5
<i>Geranium sylvaticum</i>	4634	143	19	32	28	49	9	41	CR	40±1,5
<i>Heracleum asperum</i>	119764	3690	17	32	9	85	1	14	C	56±1,9
<i>Heracleum leskovii</i>	369435	30233	18	12	29	95	2	3	C	56±2,0
<i>Heracleum sosnowskyi</i>	459150	25380	15	18	30	92	0	8	C	133±5,1
<i>Hesperis voronovii</i>	1792	67	14	27	31	46	0	54	CR	37±0,3
<i>Inula helenium</i>	173941	9915	15	18	32	93	0	7	C	106±3,2
<i>Lamium album</i>	2821	113	21	25	10	44	19	37	CR	25±1,6
<i>Lapsana communis</i>	2397	38	14	63	11	35	0	65	CR	52±2,4
<i>Ligusticum alatum</i>	55058	2398	25	23	12	75	12	12	C	81±3,1
<i>Lilium monadelphum</i>	986	71	30	14	33	27	57	16	S	56±2,9
<i>Milium effusum</i>	2100	121	50	17	34	24	61	15	S	64±1,8
<i>Pedicularis atropurpurea</i>	11538	461	17	25	35	69	3	28	CR	75±2,7
<i>Petasites albus</i>	78133	2508	14	31	36	84	0	16	C	82±4,0
<i>Rumex alpestris</i>	2736	104	13	26	13	52	0	48	CR	21±0,7
<i>Rumex alpinus</i>	16165	2103	14	8	14	40	60	0	CS	66±4,3
<i>Senecio platyphylloides</i>	36489	1450	18	25	38	79	3	18	C	98±0,3
<i>Seseli libanotis</i>	12555	803	26	16	39	63	25	12	C	33±1,5
<i>Silene multifida</i>	2994	95	17	31	40	49	1	50	CR	77±2,8
<i>Symphytum asperum</i>	8624	227	14	38	41	60	0	40	CR	70±2,2
<i>Telekia speciosa</i>	124464	3880	15	32	42	86	0	14	C	116±3,1
<i>Trifolium pratense</i>	1182	56	24	21	43	30	36	34	CSR	27±1,4
<i>Veratrum album</i>	33214	1609	15	21	15	84	0	16	C	70±3,1
<i>Veronica filiformis</i>	120	6	46	19	17	4	73	22	SR	3±0,2
<i>Vicia tenuifolia</i>	1271	46	21	27	16	31	23	46	CSR	42±2,2

LA — площадь листа мм², LDW — масса сухого листа, мг; LDMC — содержание сухого вещества, %, SLA — удельная листовая поверхность, мм²/мг; № — номер вида на схеме «треугольнике Грайма» (рис. 1); C — вклад конкурентной стратегии, %; S — вклад стресс-толерантной стратегии, %; R — вклад рудеральной стратегии, %, CSR — экологическая стратегия вида; H — вегетативная высота вида с ошибкой среднего, см, n=25

матическим алгоритмом к двум типам (C/CR, R/CR, S/SR, CR/CSR и пр., таблица). Для них характерно наличие достаточно сильно выраженных черт двух групп. Например, для *Aconitum orientale* в большей степени характерна С-стратегия, но также его можно отнести и к CR. При построении ординационной диаграммы и дальнейшем анализе данных подобные случаи мы относили к той группе, черты которой являются более выраженным в процентном соотношении. В чистом виде конкурентная стратегия (C) показана для *Angelica purpurascens*, *A. tatianae*, *Cirsium chlorocomos*, *Heracleum asperum*, *H. leskovii*, *H. sosnowskyi*, *Inula helenium*, *Petasites albus*, *P. hybridus*, *Telekia speciosa*, *Veratrum album*. Конкурентно-рудеральную (CR) стратегию имеют такие виды, как *Aconitum nasutum*, *Cirsium simplex*, *Geranium sylvaticum*, *Hesperis voronovii*, *Rumex alpestris*, *Silene multifida*, *Symphytum asperum*. Остальные типы стратегий включают в себя максимум 4 вида. Группа CS включает в себя два вида: *Achillea millefolium*, *Dactylis glomerata*. Три вида имеют сильно выраженные черты стресс-толерантной (S) стратегии: *Veronica filiformis*, *Lilium monadelphum*, *Millium effusum*. Выявлены примеры смешанной CSR-стратегии, при которой примерно в равной степени выражены черты всех трех типов (*Trifolium pratense*, *Astrantia maxima*).

Показана положительная корреляция выраженности конкурентной стратегии у вида с его вегетативной высотой ($r=0,58$, $p<0,05$, рис. 2). Виды выделенных стратегий имеют значимые различия по высоте (ANOVA, $p<0,05$). По результатам апостериорного теста Геймса-Ховела показаны значимые отличия высот видов С-стратегии от высот для CSR и R-стратегий ($p<0,05$) (рис. 3).

Обсуждение

Для высокотравных субальпийских лугов Центрального Кавказа показано, что основная масса листьев сосредоточена в верхней части полога, который располагается на высоте 900–1300 мм. Средняя высота изученных нами луговых растений составляет 620 ± 50 мм ($n=42$), однако для видов конкурентной и конкурентно-рудеральных стратегий, которые, как правило, имеют оценку проективного покрытия более «2» по шкале Браун-Бланке (более 5% покрытия) в исследуемых сообществах [6], средняя высота составляет 849 ± 70 мм. Это виды, которые, во многом обуславливают облик высокотравья и приводятся в литературных источниках как «характерные» [5]. Для них типичны крупные горизонтально расположенные листья (со средней площадью $0,26\pm 0,1$ м²), затеняющие более низкие растения. При этом

виды других экологических групп значимо ниже конкурентов, но между собой по высоте не различаются. Схожая структура (отсутствие выраженной ярусной структуры) была показана для ряда кустарниковых сообществ Альп, а также для высокотравных сообществ Камчатки [22].

Полученный нами спектр стратегий значительно отличается от полученных с помощью той же методики, но в других регионах и фитоценозах. Так, для малонарушенных альпийских лугов Тибетского плато (Китай), а также для песчаных дюн северо-восточной Бразилии показано абсолютное доминирование видов стресс-толерантной стратегии [23, 24].

В изученных нами фитоценозах доминируют виды стратегий С и CR. Сходные результаты получены в исследованиях высокотравных лугов Швейцарских Альп, где выявлено наибольшее число видов с CSR-стратегией, а следующие по многочисленности группы – это С- и CS-стратегии [25]. На субальпийских

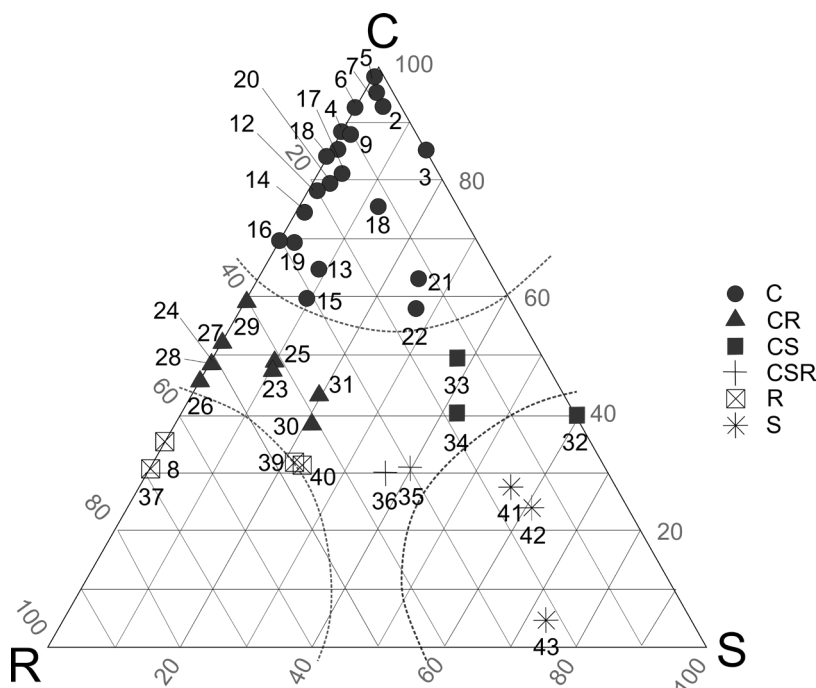


Рис. 1. Ординация видов в «треугольнике Грайма».

Номера точек соответствуют номерам видов в таблице. С — конкурентная стратегия, S — стресс-толерантная стратегия, R — рудеральная стратегия. Пунктирными дугами показаны области базовых стратегий (C, S, R) в «чистом» виде.

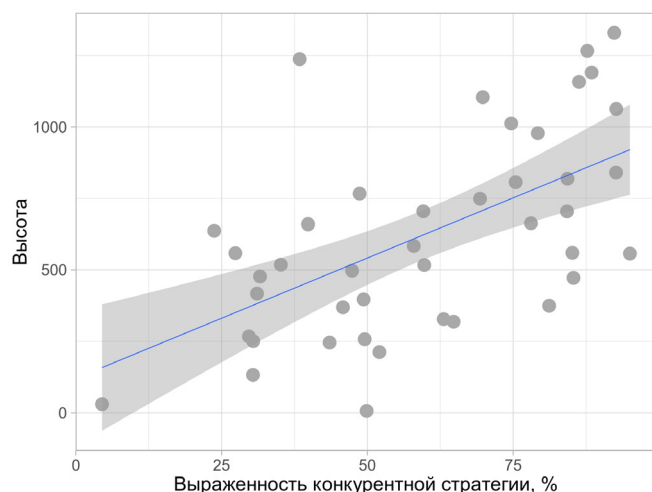


Рис. 2. Зависимость выраженности конкурентной стратегии от средней высоты вида. Показана линия регрессии линейной модели, светло-серый цвет — доверительный интервал 0,95; $r=0,58$, $p<0,05$

лугах в Италии (1780 м над уровнем моря) в условиях низкого выпаса и значительного удобрения доминируют виды CR- и SR-стратегий, а на выпасаемых малоудобряемых лугах для доминантов более характерны S- и CSR-стратегии [26]. Среди изученных нами видов CS-стратегия показана только для *Rumex alpinus*. Несколько видов, которые можно в равной степени отнести к смешанной CSR-стратегии (*Campanula lactiflora*, *Lamium album*, *Achillea millefolium*, *Dactylis glomerata*), обладают широкой экологической амплитудой и распространены в обширном круге экотопов [10].

Высокую степень конкурентности видов высокотравных лугов можно объяснить следующим образом. Для этих фитоценозов характерно высокое проективное покрытие (в среднем, 95%) со средней высотой больше 600 мм (для сравнения, средняя высота растений лугов альпийского пояса Тебердинского заповедника составляет 108 мм). Основной полог перехватывает большую часть света и затрудняет рост более низкорослых и медленно растущих растений. В связи с этим сосуществующие виды вынуждены достигать сходной (и большей) высоты для получения достаточного количества солнечного света. Увеличение высоты ведет к общему увеличению линейных размеров растения [17]. Это обуславливает низкую флористическую насыщенность сообществ (около 10–15 видов на пробной площади) [8] и позволяет объяснить, почему виды С-стратегии получают преимущество в этих условиях. Выбранные нами для анализа виды являются константными, доминантными и характерными для этого типа

фитоценозов. Они составляют почти половину из общего видового пула таких лугов (около 80 видов) и занимают более 80% проективного покрытия на пробных площадях [8]. Виды, не включенные в данную статью, имеют значительно более низкую встречаемость (менее 5 раз в 40 описаниях) и проективные покрытия не больше 1 по шкале Браун-Бланке [8].

Подавляющее большинство (72%) изученных видов имеет в той или иной степени выраженные черты R-стратегии (в среднем $26\pm2\%$). Можно предположить, что это связано с активным использованием высокогорных ценозов в качестве пастбищ на протяжении многих столетий. Под влиянием выпаса в субальпийских ценозах крупные и быстрорастущие виды с рудеральными чертами имеют конкурентное преимущество перед другими растениями.

Встречающиеся в обсуждаемых сообществах виды с чертами S-стратегии морфологически сильно различаются. *Veronica filiformis* произрастает под пологом лугов в напочвенном ярусе

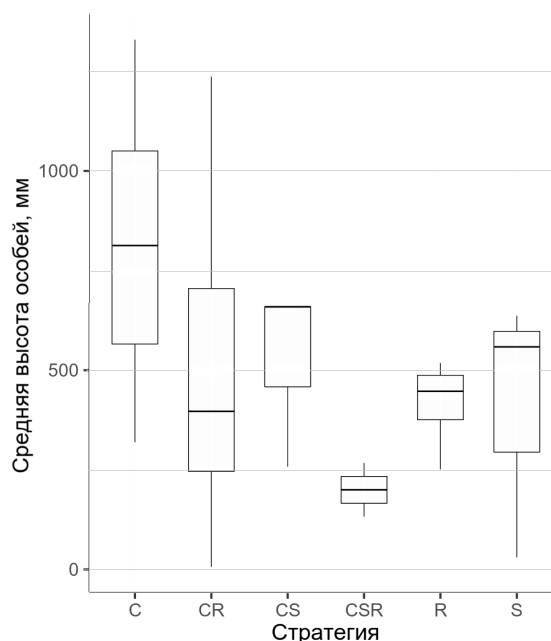


Рис. 3. Диаграмма размаха высот видов растений субальпийского высокотравья различных стратегий. По оси ординат — средние значения высоты особей внутри видов. Тип графика — «ящик с усами»

(средняя высота — 30 ± 2 мм), в условиях затенения листьями более крупных доминантов. *Lilium monadelphum* встречается в ценозах спорадически, растения этого вида имеют среднюю высоту листьев 558 ± 30 мм с одиночным облиственным стеблем и линейно-ланцетными листьями [8]. *Millium effusum* — один из немногих злаков, произрастающих на высокотравных лугах с вегетативной высотой 637 ± 18 мм.

Таким образом, всего для изученных видов показано шесть типов стратегий, при этом многие виды можно отнести к смешанным стратегиям. Нами подтверждена гипотеза о том, что константные виды субальпийского высокоотравья Северо-Западного Кавказа имеют значительно (до 95%) выраженные черты конкурентной стратегии (за исключением *V. filiformis*). Показано, что в большинстве случаев они сочетаются с чертами рудеральности. Степень выра-

женности конкурентной стратегии возрастает с увеличением линейных размеров растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №19-14-00038).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Körner C. Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems. Berlin: Springer, 2003. 345 pp.
2. Grime J.P. Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties. Chichester: John Wiley & Sons, 2001. 176 pp.
3. Caccianiga M., Luzzaro A., Pierce S., Ceriani R.M., Cerabolini B. The functional basis of a primary succession resolved by CSR classification // Oikos. 2006. Vol. 112. N 1. P. 10–20.
4. Huseyinoglu R., Yalcin E. Competitive, stress-tolerant and ruderal based classification of some plant species in an Alpine community of the Giresun Mountains in Turkey // J. Env. Biol. 2017. Vol. 38. N 5. P. 761–769.
5. Barba-Escoto L., Ponce-Mendoza A., García-Romero A., Calvillo-Medina R.P. Plant community strategies responses to recent eruptions of Popocatepetl volcano, Mexico // J. Veg. Sci. 2019. Vol. 30. N 2. P. 375–385.
6. Petriccione B., Bricca A. Thirty years of ecological research at the Gran Sasso d'Italia LTER site: climate change in action // Nat. Conserv. 2019. Vol. 34. N 1. P. 9–39.
7. Pierce S., Negreiros D., Cerabolini B.E., et al. A global method for calculating plant CSR ecological strategies applied across biomes worldwide // Funct. Ecol. 2017. Vol. 31. N 2. P. 444–457.
8. Onipchenko V.G. Alpine vegetation of the Teberda Reserve, the Northwestern Caucasus. Zurich: Geobotanisches Institut ETH, 2002. 130 pp.
9. Anten N.P.R., Hirose T. Interspecific differences in above-ground growth patterns result in spatial and temporal partitioning of light among species in a tall-grass meadow // J. Ecol. 1999. Vol. 87. N 4. P. 583–597.
10. Michl T., Dengler J., Huck S. Montane-subalpine tall-herb vegetation (*Mulgedio-Aconitetea*) in central Europe: Large-scale synthesis and comparison with northern Europe // Phytocoenologia. 2010. Vol. 40. N 2–3. P. 117–154.
11. Pickering C.M., Growcock A.J. Impacts of experimental trampling on tall alpine herbfields and subalpine grasslands in the Australian Alps // J. Environ. Manage. 2009. Vol. 91. N 2. P. 532–540.
12. Rehder H. Nitrogen relations of ruderal communities (*Rumicion alpini*) in the Northern Calcareous Alps // Oecologia. 1982. Vol. 55. N 1. P. 120–129.
13. Grime J.P. Vegetation classification by reference to strategies // Nature. 1974. Vol. 250. N 5461. P. 26–31.
14. Grime J.P. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory // Am. Nat. 1977. Vol. 111. N 982. P. 1169–1194.
15. Grime J.P. The CSR model of primary plant strategies—origins, implications and tests // Plant evolutionary biology. Dordrecht: Springer, 1988. P. 371–393.
16. Pérez-Harguindeguy N., Díaz S., Garnier E., et al. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide // Aust. J. Bot. 2013. Vol. 61 N 3. P. 167–234.
17. Garnier E., Navas M.-L., Grigulis K. Plant functional diversity: organism traits, community structure, and ecosystem properties. Oxford Univ. Press, 2016. 231 pp.
18. Cerabolini B.E., Brusa G., Ceriani R.M., De Andreis R., Luzzaro A., Pierce S. Can CSR classification be generally applied outside Britain? // Plant Ecol. 2010. Vol. 210. N 2. P. 253–261.
19. Pierce S., Brusa G., Vagge I., Cerabolini B.E. Allocating CSR plant functional types: the use of leaf economics and size traits to classify woody and herbaceous vascular plants // Funct. Ecol. 2013. Vol. 27. N 4. P. 1002–1010.
20. Cornelissen J.H.C., Lavorel S., Garnier E., Díaz S., Buchmann N., Gurvich D.E., Reich P.B., ter Steege H., Morgan H.D., van der Heijden M.G.A.,

Pausas J.G., Poorter H. A handbook of protocols for standardized and easy measurement of plant functional traits worldwide // *Aust. J. Bot.* 2003. Vol. 51. N 4. P. 335–380.

21. Ониищенко В.Г., Зернов А.С., Воробьева Ф.М. Сосудистые растения Тебердинского заповедника (аннотированный список видов) / Под ред. И.А. Губанова. М.: Макс Пресс, 2011. 144 с.

22. Tappeiner U., Cernusca A. Microclimate and fluxes of water vapour, sensible heat and carbon dioxide in structurally differing subalpine plant communities in the Central Caucasus // *Plant, Cell Environ.* 1996. Vol. 19. N 4. P. 403–417.

23. Silva J.L.A., Souza A.F., Caliman A., Voigt E.L., Lichston J.E. Weak whole-plant trait coordination in a seasonally dry South American

stressful environment // *Ecol. Evol.* 2018. Vol. 8. N 1. P. 4–12.

24. Wang J., Zhang C., Yang H., Mou C., Mo L., Luo P. Plant community ecological strategy assembly response to yak grazing in an alpine meadow on the eastern Tibetan Plateau // *Land. Degrad. Dev.* 2018. Vol. 29. N 9. P. 2920–2931.

25. Vittoz P., Randin C., Dutoit A., Bonnet F., Hegg O. Low impact of climate change on subalpine grasslands in the Swiss Northern Alps // *Glob. Chang. Biol.* 2009. Vol. 15. N 1. P. 209–220.

26. Cerabolini B., Pierce S., Luzzaro A., Ossola A. Species evenness affects ecosystem processes in situ via diversity in the adaptive strategies of dominant species // *Plant Ecol.* 2010. Vol. 207. N 2. P. 333–345.

Поступила в редакцию 22.05.2019 г.

После доработки 11.07.2019 г.

Принята в печать 15.07.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

COMPETITIVE STRATEGY OF THE SUBALPINE TALLGRASS SPECIES OF NORTHWEST CAUCASUS

K.V. Dudova^{1,*}, T.M. Dzhatdоеva², S.V. Dudov¹, A.A. Akhmetzhanova¹, D.K. Tekeev³, V.G. Onipchenko^{1,3}

¹Department of Geobotany, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²«Technological college KCHR», Svobody str. 62A, Cherkessk, 369000, Russia;

³Teberda State Natural Biosphere Reserve, Badukskij per. 1, Teberda, 369210, Russia
*e-mail: k.v.dudova@yandex.ru

We aimed to research the spectrum of the CSR strategies for subalpine tallgrass communities of the Northwest Caucasus (Teberda state natural biosphere reserve). The community is typical of the subalpine zone in the altitude range of 1850 to 2600 m (mean 2300 m). It occupies the lower portions of slopes, valley bottoms and depressions on slopes with significant winter snowpack accumulation. Stable water supply from the upper part of slopes is an important factor increasing its productivity. A few tall and highly productive species have established at such sites, since grazing was stopped. The community dominants are *Rumex alpinus*, *Senecio platyphylloides*, *Cephalaria gigantea*, *Ligusticum alatum* and other. Accomplish this we measured key functional traits of the leaves: leaf area, wet leaf mass, dry leaf mass. On the basis of these traits we calculated CSR-strategies for the 42 species of the tallgrass communities. We defined six types of CSR-strategies and confirmed that most of explored species has strongly pronounced traits of the competitive (C) and competitive-ruderal (CR) strategies. For the 11 species C-strategy was identified (for example, *Angelica purpurascens*, *A. tatianae*, *Cirsium chlorocomos*, *Heracleum asperum*, *H. leskovii*, *H. sosnowskyi*). The degree of C-selection has positive correlation with mean height of the species. CR-strategy was shown for the *Aconitum nasutum*, *Cirsium simplex*, *Geranium sylvaticum*, *Hesperis voronovii*, *Rumex alpestris* and other. Two species (*Achillea millefolium*, *Dactylis glomerata*) have competitive-stress-tolerant strategy (CS). Stress-tolerant (S) strategy has been identified for the three species *Veronica filiformis*, *Lilium monadelphum*, *Millium effusum*. Two species have CSR-strategy (*Trifolium pratense*, *Astrantia maxima*). Also, 70% species have the ruderal strategy features (on average,

26%). We assume it is result of the anthropogenic influence for many centuries. Our results contradict the popular point of view that highland species have stress-tolerant strategy. This can be explained by the ecological conditions in the lower portions of slopes, valley bottoms and depressions on slopes. In this conditions competitive species are most adaptive. Our hypotheses was supported; constant Caucasus species of the subalpine grass communities have significantly developed characteristics of competitive strategies (up to 95%) (except *V. filiformis*).

Keywords: *functional traits, CSR strategies, ecological strategies, tallgrass, subalpine meadows, plant height, Teberda State Reserve*

Сведения об авторах

Дудова Ксения Вячеславовна — аспирант кафедры геоботаники биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-50-21; e-mail: k.v.dudova@yandex.ru

Джатдоева Тамара Магомедовна — преподаватель химии и экологических дисциплин «Технологического колледжа». Тел.: 8-878-795-11-97; e-mail: dzhatdоеva1975@mail.ru

Дудов Сергей Валерьевич — науч. сотр. кафедры геоботаники биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-50-21; e-mail: serg.dudov@gmail.com

Ахметжанова Асем Алиякпаровна — ст. науч. сотр. кафедры геоботаники биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-50-21; e-mail: assemok@mail.ru

Текеев Джамал Кемалович — зам. директора по научной работе Тебердинского государственного биосферного заповедника. Тел.: 8-878-795-11-97; e-mail: jamal_09@mail.ru

Онипченко Владимир Гертрудович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой геоботаники биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-64; e-mail: vonipchenko@mail.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 576.367

ПРОНИЦАЕМОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ДЛЯ ЙОДИДА ПРОПИДИЯ И РАЗРУШЕНИЕ ЯДЕР КЛЕТОК В ЭПИДЕРМИСЕ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА: ДЕЙСТВИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ И ДЕТЕРГЕНТОВ**Д.Б. Киселевский*, В.Д. Самуилов**

*Кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: dkiselevs@mail.ru

Исследовали повреждение плазматической мембраны (ПМ) клеток в эпидермисе листьев гороха, определяемое по ее проницаемости для йодида пропидия (propidium iodide, PI), связывающегося с ДНК клеточных ядер, и программируемую клеточную смерть, регистрируемую по разрушению клеточных ядер. ПМ эпидермальных клеток в изолированном эпидермисе проницаема для PI (он окрашивал их ядра). ПМ устьичных клеток не пропускала PI. Индуктор программируемой клеточной смерти KCN вызывал разрушение ядер и эпидермальных, и устьичных клеток. KCN-индуцированный распад ядер устьичных клеток сопровождался проникновением PI в клетки. Поликатион хитозан в концентрации 0,1 мг/мл вызывал разрушение ядер эпидермальных клеток, а в концентрации 1 мг/мл приводил к возникновению проницаемости ПМ устьичных клеток для PI, окрашивающего их ядра. Другие поликатионы (цитохром c, полилизин, полиэтиленмин и протамин) тоже вызывали окрашивание ядер устьичных клеток PI. Полианионы (полиакриловая кислота, декстран и гепарин) инициировали разрушение клеточных ядер, которому сопутствовало проникновение PI в клетки. Детергенты тритон X-100 и лаурилдиметиламин-N-оксид индуцировали проницаемость ПМ устьичных клеток для PI. KCN не вызывал разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе, обработанном детергентами. Обработка эпидермиса тритоном X-100 (в течение 2 ч с его последующей отмывкой) усиливала разрушение ядер устьичных клеток, вызванное KCN. Поликатионы полиэтиленмин и протамин предотвращали, а хитозан, цитохром c и полилизин, напротив, усиливали KCN-индуцированное разрушение ядер устьичных клеток. Результаты свидетельствуют о том, что разрушение клеточных ядер при индукции гибели клеток KCN или полианионами сопровождается повреждением ПМ (создающим ее проницаемость для PI). Повреждение ПМ, вызванное детергентами или поликатионами до обработки клеток KCN, может предотвращать или, напротив, усиливать разрушение клеточных ядер.

Ключевые слова: *программируемая клеточная смерть, плазматическая мембрана, детергенты, полиэлектролиты, хитозан, йодид пропидия*

Описаны две основные формы программируемой клеточной смерти (ПКС) у растений: 1) вакуолярная клеточная смерть, при которой наблюдается увеличение объема вакуоли и уменьшение объема цитоплазмы, и 2) некротическая клеточная смерть, которая сопровождается набуханием клеточных органелл и повреждением плазматической мембраны (ПМ) на ранних ее этапах [1]. При апоптозе, одной из форм ПКС у животных, целостность ПМ сохраняется даже после фрагментации клеточных ядер, вплоть до

финальной стадии процесса. Некроз, в отличие от апоптоза, ассоциирован с повреждением ПМ и последующей потерей внутриклеточного содержимого [2]. Нарушение ПМ, опосредованное специфическими порами и каналами, наблюдается при пироптозе и некроптозе — двух формах программируемого некроза, а также в ходе вторичного некроза на поздних стадиях апоптоза [3].

Представляет интерес вопрос о действии повреждения ПМ на гибель клеток растений:

можно ли инициировать ПКС в клетках с поврежденной ПМ? Механизм апоптоза у животных реализуется через активацию каспаз — специализированных цистеиновых протеаз, гидролизующих клеточные белки [4]. У растений есть принимающие участие в ПКС гидролитические ферменты, изолированные от цитоплазмы в клеточных компартментах. Среди них фитаспазы, которые синтезируются как неактивные белки-предшественники, созревая, выходят в апопласт и возвращаются в клетки при индукции ПКС [5]. Существуют и другие вовлеченные в ПКС у растений протеазы, локализованные в апопласте, вакуолях или эндоплазматическом ретикулуме — клеточных компартментах, отделенных от цитоплазмы мембраной [6]. Можно предположить, что повреждение клеточных мембран будет способствовать проникновению протеаз в цитоплазму и ПКС. С другой стороны, высвобождение клеточного содержимого через поврежденную ПМ, происходящее при непрограммируемом некрозе, может нарушить внутриклеточные процессы, включая ПКС.

Ранее была исследована гибель эпидермальных и устьичных клеток в эпидермисе листьев гороха. KCN вызывал ПКС, которая сопровождалась разрушением клеточных ядер, подавлялась антиоксидантами и анаэробнозом, усиливалась при воздействии H_2O_2 [7], была чувствительна к ингибиторам синтеза белков [8], зависела от энергообеспечения [9]. Для KCN-индуцированной ПКС характерны черты апоптоза: маргинация и конденсация ядерного хроматина [10], распад клеточных ядер на фрагменты [7, 11], межнуклеосомная фрагментация ДНК [9, 11].

Хитозан, поли(β -1,4)-N-ацетилглюкозамин, полученный путем неполного деацетилирования хитина из панциря ракообразных, вызывал гибель эпидермальных, но не устьичных клеток. Подобно KCN, хитозан индуцировал ПКС, сопровождаемую разрушением клеточных ядер и межнуклеосомной фрагментацией ДНК, она подавлялась антиоксидантами и анаэробнозом, была чувствительна к ингибиторам синтеза белков и энергетического обмена [12]. Как компонент клеточной стенки грибов хитозан относится к PAMP (pathogen-associated molecular patterns, ассоциированные с патогенами молекулярные структуры) и представляет собой элиситор, вызывающий гиперчувствительный ответ — гибель клеток растения, ограничивающую дальнейшее распространение патогенов. У растений хитиновые олигосахариды распознаются трансмембранными рецептор-подобными белками [13]. Наряду с гибелью клеток растений,

хитозан может вызывать повреждение ДНК, изменения ядерного хроматина, экспрессию ассоциированных с патогенозом генов PR (pathogenesis-related), синтез фитогормонов и фитоалексинов, активацию MAP-киназ (mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемые протеинкиназы), образование активных форм кислорода [14].

Хитозан — поликатион. Поликатионы нейтрализуют отрицательный поверхностный заряд мембран, обусловленный диссоциацией кислотных групп липидов и белков. Поликатионы полилизин, полиэтиленмин и протамин стимулировали образование сериновой протеиназы клетками *Bacillus subtilis*. Полианионы гепарин, полиакриловая кислота и декстран не обладали подобным действием [15]. Оптимальные концентрации поликатионов находились в нано- и микромолярном диапазонах, хотя для одновалентных катионов (Na^+ , K^+ , холин), вызывающих такой же эффект, она составляла 100 мМ. Поликатионы, используемые при генной трансформации для доставки ДНК в клетки, повышают проницаемость ПМ [16]. Хитозан увеличивал проницаемость ПМ клеток растений: вызывал высвобождение электролитов и белков из культивируемых клеток сои. Такое же действие на клетки растений оказывали другие поликатионы: полилизин, диэтиламиноэтилдекстран, протамин [17]. Хитозан индуцировал проникновение красителя йодида пропидия (propidium iodide, PI) в устьичные клетки эпидермиса из листьев гороха (PI не проходит через неповрежденную плазматическую мембрану) [18]. Предполагается, что хитозан, находящийся на наружной поверхности клеточной стенки некоторых фитопатогенных грибов (*Fusarium solani* — возбудитель фузариоза гороха, *Puccinia striiformis* — возбудитель ржавчины пшеницы), способствует оттоку питательных веществ из клеток растений в клетки грибов и проникновению ферментов грибов в клетки растений [17]. Дeterгенты тоже повреждают ПМ: тритон X-100 вызывал гемолиз эритроцитов (высвобождение гемоглобина), а в более высокой концентрации — солюбилизацию липидов [19].

В настоящей работе исследовано действие хитозана, других полиэлектролитов и детергентов на проницаемость ПМ для PI и на KCN-индуцированное разрушение ядер клеток в эпидермисе из листьев гороха.

Материалы и методы

Опыты проводили на пленках эпидермиса, изолированных с нижней поверхности листьев 7–15-суточных проростков гороха *Pisum sativum*

Л. сорта Альфа. Растения выращивали в условиях периодического освещения (свет/темнота — 16/8 ч) металлогалогеновой лампой ДРiЗ (250 Вт; Reflux, Россия) с интенсивностью 70–100 мкЕ/(м²·с) при 22–28°С. Пленки эпидермиса отделяли с нижней поверхности листьев пинцетом, помещали в бидистиллированную воду, после чего добавляли реагенты. Состав, последовательность добавок и дополнительные условия экспериментов представлены в подписях к рисункам.

Для определения состояния плазматической мембраны клеток использовали флуоресцирующий краситель PI, связывающийся с ДНК в клеточных ядрах и не проникающий через нативную мембрану [20]. Пленки эпидермиса окрашивали в течение 20 мин 2 мкМ PI (в вариантах с полиэтиленимином или протамином — 20 мкМ PI, поскольку при использовании 2 мкМ PI с этими соединениями выход флуоресценции мал). Наблюдения проводили на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss Axiovert 200M (Германия). Флуоресценцию PI возбуждали светом с длиной волны 525–565 нм и регистрировали при 575–640 нм. Определяли долю клеток с флуоресценцией PI, т.е. с проницаемой для PI плазматической мембраной.

ПКС регистрировали по разрушению клеточных ядер [7]. Эпидермис обрабатывали 5 мин фиксатором Батталья (смесь хлороформа, 96%-ного этанола, ледяной уксусной кислоты и 40%-ного формалина в соотношении 5:5:1:1), промывали 10 мин этанолом и 5 мин водой для удаления фиксатора, окрашивали 20 мин гематоксилином Карацци. Окрашенные пленки эпидермиса промывали водопроводной водой и исследовали с помощью световой микроскопии. Определяли долю клеток с разрушенными ядрами и клеток, лишенных ядер.

В каждом варианте эксперимента исследовали 300–500 клеток в 2–3 пленках эпидермиса. Эксперименты повторяли не менее 3 раз. Ниже приводятся данные типичных экспериментов, средние значения $\pm$ 95%-ные доверительные интервалы. Гипотезу о значимых отличиях средних значений полученных выборок (контроля в сравнении с одним из вариантов опыта) проверяли с помощью t-критерия Стьюдента при уровне статистической значимости $p = 0,01$.

Для отмывки от детергентов пленки эпидермиса переносили в сосуд с 100 мл бидистилли-

рованной воды и, придерживая их пинцетом, отмывали 5 мин, снова переносили в сосуд с 100 мл бидистиллированной воды и отмывали 5 мин, затем переносили в бидистиллированную воду.

В экспериментах с полиэлектролитами использовали хитозан фирмы «Fluka», цитохром с, полилизин, полиэтиленимин, полиакриловую кислоту и декстран фирмы «Sigma-Aldrich», протамин ООО «Эллара», гепарин «Московского эндокринного завода». Молекулярные массы цитохрома с, полилизина, полиэтиленимина, протамина, полиакриловой кислоты, декстрана и гепарина — 12,4; 3; 5; 6; 1,2; 15 и 15 кДа, а их молярные концентрации при добавлении 1 мг/мл — 81, 333, 200, 167, 833, 67 и 67 мкМ, соответственно.

Результаты и обсуждение

В отделенных от листьев пленках эпидермиса PI флуоресцировал в ядрах эпидермальных, но не устьичных клеток (рис. 1). Инкубация пленок эпидермиса с детергентом тритоном X-100 вызывала флуоресценцию PI в ядрах

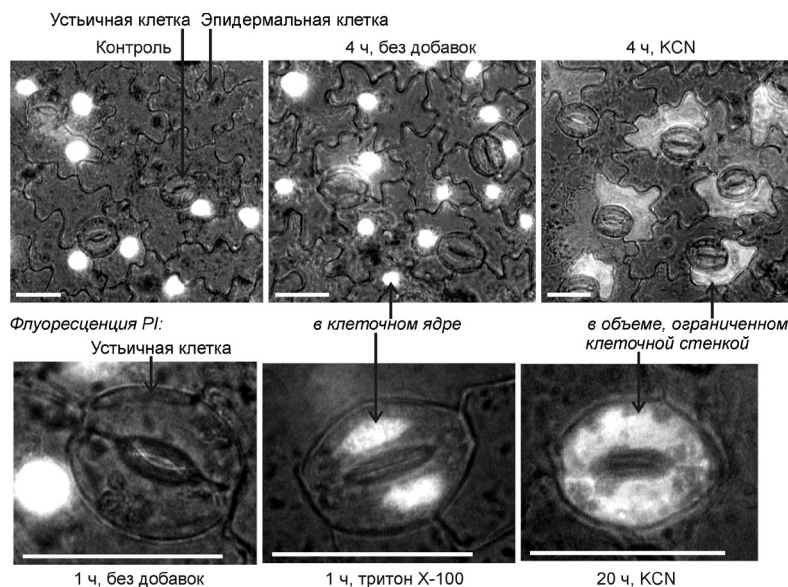


Рис. 1. Флуоресценция PI в эпидермисе из листьев гороха. Пленки эпидермиса сразу после отделения от листа (контроль) или после инкубации в бидистиллированной воде в течение 1, 4 или 20 ч (без добавок, с 2,5 мМ KCN или с 1 мМ тритона X-100) окрашивали PI (время инкубации и добавленные реагенты отмечены на рисунке). Масштабный отрезок — 20 мкм.

устьичных клеток. KCN после 4 ч воздействия разрушал ядра эпидермальных клеток, а после 20 ч — ядра устьичных клеток: флуоресценция PI в ядрах исчезала, появляясь в объеме, ограниченном клеточной стенкой. Разрушение ядер устьичных клеток сопровождалось проникновением PI в клетки (рис. 1). Эпидермальные клет-

ки сообщаются между собой и с клетками мезофилла с помощью плазмодесм, являясь частью симпласта листа. Устьичные клетки изолированы — связь через плазмодесмы имеется только между двумя соседними клетками, образующими устьице [21].

В изолированных пленках эпидермиса все устьичные клетки имеют ядра, но около 20–30% эпидермальных клеток лишены ядер

(рис. 2, А). Хитозан в концентрации 0,1 мг/мл индуцировал разрушение ядер эпидермальных, но не устьичных клеток (рис. 2, А), и не действовал на проницаемость их ПМ для PI (рис. 2, Б). Действуя как элиситор, хитозан вызывает гибель клеток растений [12, 22].

В концентрации 1 мг/мл хитозан не разрушал клеточных ядер (рис. 2, А), но вызывал проницаемость ПМ устьичных клеток для PI (рис. 2, Б). Другие поликатионы (цитохром с, полилизин, полиэтиленмин и протамин) оказывали сходное действие на клетки эпидермиса: не разрушали ядра (рис. 2, А), но индуцировали проницаемость ПМ устьичных клеток для PI (рис. 2, Б). Полианионы (полиакриловая кислота, декстран и гепарин) индуцировали разрушение ядер эпидермальных и устьичных клеток (рис. 2, А), сопровождавшееся проникновением PI в устьичные клетки и его флуоресценцией в объеме, ограниченном клеточной стенкой (рис. 2, Б).

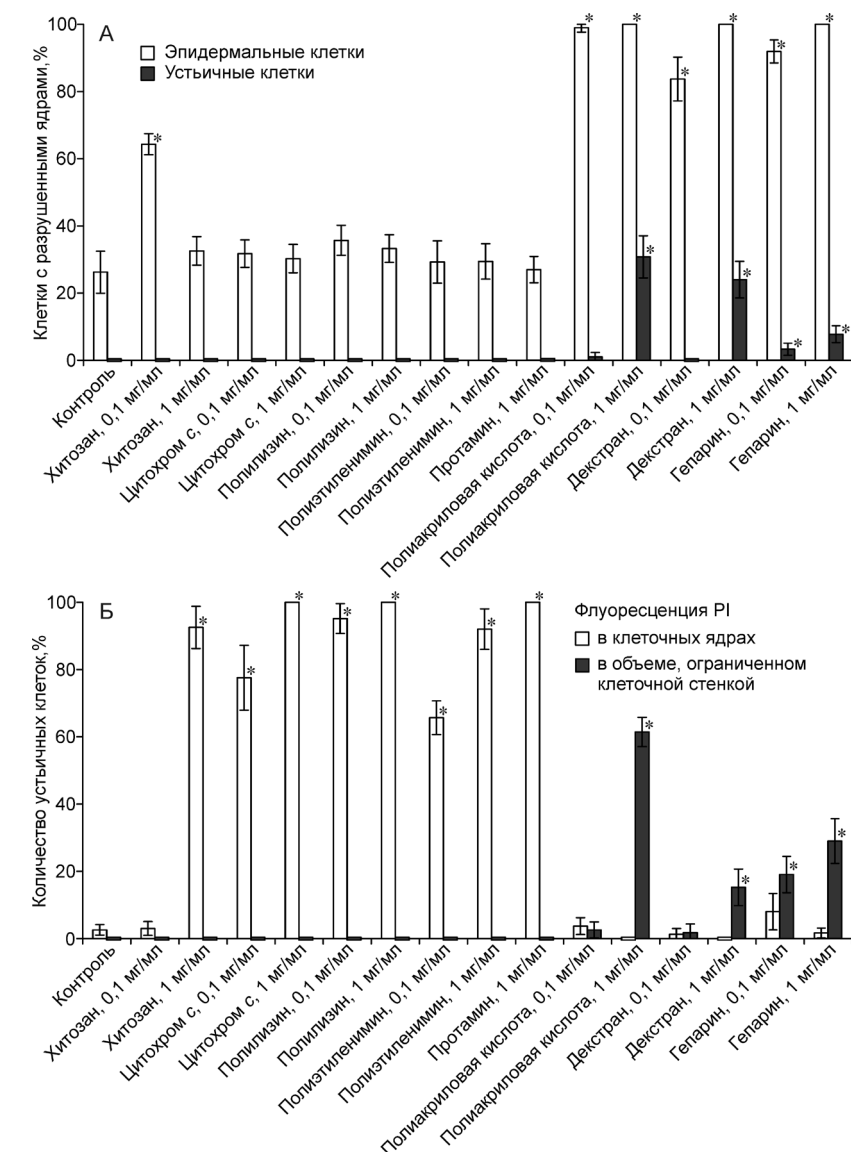


Рис. 2. Действие поликатионов и полианионов на состояние ядер эпидермальных и устьичных клеток (А) и на проницаемость плазматической мембраны устьичных клеток для PI (Б) в эпидермисе из листьев гороха. Пленки эпидермиса инкубировали в бидистиллированной воде без добавок (контроль) или с полиэлектролитами при перемешивании на магнитной мешалке 30 мин и еще 3 ч без перемешивания. После инкубации у части пленок эпидермиса определяли количество клеток с разрушенными ядрами (А). Оставшиеся пленки эпидермиса окрашивали PI и регистрировали флуоресценцию PI в устьичных клетках (Б). Представлены средние значения $\pm$ 95%-ные доверительные интервалы. * — варианты, имеющие значимые отличия от контроля ($p < 0,01$).

В эксперименте, данные которого представлены на рис. 3, пленки эпидермиса обрабатывали детергентами или поликатионами и убеждались в том, что эта обработка вызывает проницаемость ПМ устьичных клеток для PI, определяемую по его флуоресценции в клеточных ядрах. Оставшиеся неокрашенными PI пленки эпидермиса, содержащие клетки с ПМ, поврежденной детергентами или поликатионами, инкубировали с KCN и определяли разрушение ядер устьичных клеток. В контроле (без детергентов и поликатионов) KCN вызывал разрушение ядер в ~ 70% устьичных клеток. Детергенты тритон X-100 или лаурилдиметиламин-N-оксид (ЛДАО) индуцировали проницаемость ПМ устьичных клеток для PI. KCN не вызывал разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе, обработанном детергентом (рис. 3). Однако в эпидермисе, обработанном тритоном X-100 в течение 2 ч, а затем отмытом от детергента, KCN вызывал разрушение ядер у 100%

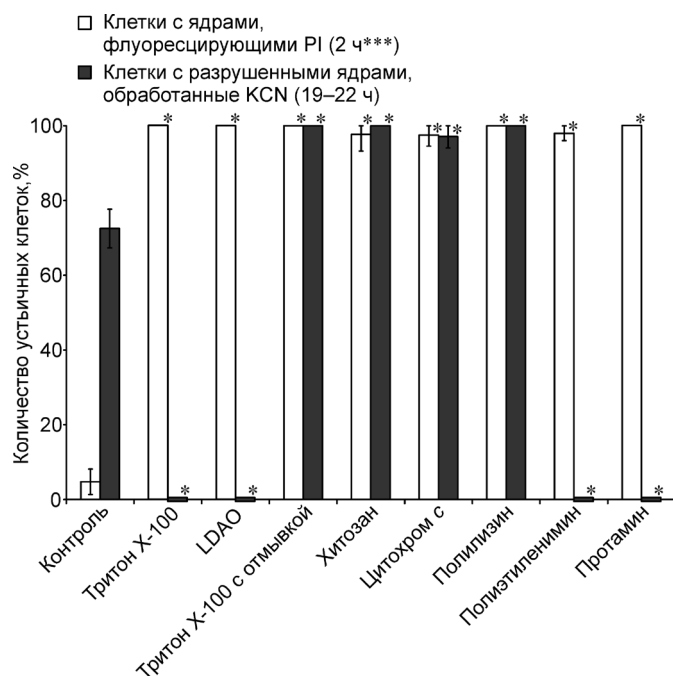


Рис. 3. Действие детергентов и поликатионов на проницаемость плазматической мембраны для PI и KCN-индуцированное разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха. Пленки эпидермиса инкубировали в бидистиллированной воде без добавок (контроль), с 1 мМ детергентами (третон X-100 или ЛДАО) или 1 мг/мл поликатионов (хитозан, цитохром с, полиэтиленимин или протамин) в течение 2 ч с перемешиванием на магнитной мешалке. *** — варианты без добавок (контроль) и с хитозаном инкубировали 4 ч. После инкубации часть пленок эпидермиса окрашивали PI и регистрировали флуоресценцию PI в ядрах устьичных клеток. Часть пленок отмывали от третона X-100 в бидистиллированной воде. К оставшимся неокрашенным пленкам эпидермиса добавляли 2,5 мМ KCN и инкубировали 19–22 ч на свету, затем определяли количество клеток с разрушенными ядрами. Представлены средние значения $\pm$ 95%-ные доверительные интервалы. * — варианты, имеющие значимые отличия от контроля ($p < 0,01$).

устьичных клеток. Поликатионы хитозан, цитохром с и полилизин усиливали KCN-индуцированное разрушение ядер устьичных клеток, а полиэтиленимин и протамин подавляли его (рис. 3).

Поликатионы хитозан, цитохром с, полилизин, полиэтиленимин и протамин индуцировали проницаемость ПМ устьичных клеток для PI, а полианионы (полиакриловая кислота, декстран и гепарин) вызывали разрушение ядер эпидермальных и устьичных клеток (рис. 2). Разрушение ядер клеток в эпидермисе гороха при индукции гибели клеток KCN или полианионами сопровождалось проникновением PI в клетки и его флуоресценцией в объеме, ограни-

ченном клеточной стенкой (рис. 1 и 2). Повреждение ПМ (ее проницаемость для PI), вызванное детергентами или поликатионами, может как предотвращать, так и усиливать KCN-индуцированное разрушение клеточных ядер (рис. 3).

Подавление KCN-зависимого разрушения ядер при повреждении ПМ может быть связано с частичной потерей клеточного содержимого и нарушением внутриклеточных процессов, в том числе процесса распада клеточных ядер. То же самое происходит при непрограммируемом некрозе [2]. Известно, что тип гибели клетки может зависеть от силы воздействия на нее: в ооцитах человека 50 мкМ H_2O_2 вызывал преимущественно апоптоз, а 1 мМ H_2O_2 — некроз, детектируемый с помощью PI [23]. Эффект детергента третона X-100 согласуется с этим: предотвращение разрушения ядер наблюдали при длительном воздействии детергента (рис. 3), но не при краткосрочном (с отмывкой).

Следует также учитывать, что поликатионы могут взаимодействовать с ядерной ДНК. Протамины — это семейство небольших белков, обогащенных остатками аргинина, которые связываются с ДНК, способствуя уплотнению генома и переводя его в неактивное состояние [24]. Полиэтиленимин используется для доставки ДНК в трансформируемые клетки. Как переносчик ДНК он эффективнее, чем полилизин. Полиэтиленимин вытесняет из ДНК связанный с ней бромистый этидий [25]. По-видимому, полиэтиленимин или протамин также мешают окрашиванию ядерной ДНК с помощью PI (см. раздел «Материалы и методы»). Не исключено, что эти поликатионы могут препятствовать действию нуклеаз и предотвращать распад клеточных ядер.

Стимуляция KCN-индуцированного разрушения ядер детергентом или поликатионами (рис. 3) предположительно обусловлена тем, что повреждение ПМ и других клеточных мембран обеспечивает доступ протеаз, подобных фитаспазам [5, 6], к цитоплазме и способствует гибели клетки. Будет ли происходить усиление или подавление разрушения ядер — это зависит от химического агента и условий обработки им клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке из средств федерального бюджета (регистрационный номер научно-исследовательской работы в ЦИТИС: АААА-А16-116021660081-0). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *van Doorn W.G., Beers E.P., Dangl J.L., et al.* Morphological classification of plant cell deaths // *Cell Death Differ.* 2011. Vol. 18. N 8. P. 1241–1246.
2. *Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 // *Cell Death Differ.* 2009. Vol. 16. N 1. P. 3–11.
3. *Zhang Y., Chen X., Gueydan C., Han J.* Plasma membrane changes during programmed cell deaths // *Cell Research.* 2018. Vol. 28. N 1. P. 9–21.
4. *Julien O., Wells J.A.* Caspases and their substrates // *Cell Death Differ.* 2017. Vol. 24. N 8. P. 1380–1389.
5. *Chichkova N.V., Tuzhikov A.I., Taliansky M., Vartapetian A.B.* Plant phytoapoptases and animal caspases: structurally unrelated death proteases with a common role and specificity // *Physiol. Plant.* 2012. Vol. 145. N 1. P. 77–84.
6. *Thomas E.L., van der Hoorn R.A.L.* Ten prominent host proteases in plant-pathogen interactions // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. N 2: 639.
7. *Samuilov V.D., Lagunova E.M., Kiselevsky D.B., Dzyubinskaya E.V., Makarova Ya.V., Gusev M.V.* Participation of chloroplasts in plant apoptosis // *Biosci. Rep.* 2003. Vol. 23. N 2–3. P. 103–117.
8. *Dzyubinskaya E.V., Kiselevsky D.B., Bakeeva L.E., Samuilov V.D.* Programmed cell death in plants: effect of protein synthesis inhibitors and structural changes in pea guard cells // *Biochemistry (Mosc.).* 2006. Vol. 71. N 4. P. 395–405.
9. *Dzyubinskaya E.V., Kiselevsky D.B., Lobysheva N.V., Shestak A.A., Samuilov V.D.* Death of stoma guard cells in leaf epidermis under disturbance of energy provision // *Biochemistry (Mosc.).* 2006. Vol. 71. N 10. P. 1120–1127.
10. *Bakeeva L.E., Dzyubinskaya E.V., Samuilov V.D.* Programmed cell death in plants: ultrastructural changes in pea guard cells // *Biochemistry (Mosc.).* 2005. Vol. 70. N 9. P. 972–979.
11. *Kiselevsky D.B., Kuznetsova Y.E., Vasil'ev L.A., Lobysheva N.V., Zinovkin R.A., Nesov A.V., Shestak A.A., Samuilov V.D.* Effect of Ca^{2+} on programmed death of guard and epidermal cells of pea leaves // *Biochemistry (Mosc.).* 2010. Vol. 75. N 5. P. 614–622.
12. *Vasil'ev L.A., Dzyubinskaya E.V., Zinovkin R.A., Kiselevsky D.B., Lobysheva N.V., Samuilov V.D.* Chitosan-induced programmed cell death in plants // *Biochemistry (Mosc.).* 2009. Vol. 74. N 9. P. 1035–1043.
13. *Liu B., Li J.-F., Ao Y., Qu J., Li Z., Su J., Zhang Y., Liu J., Feng D., Qi K., He Y., Wang J., Wang H.-B.* Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity // *Plant Cell.* 2012. Vol. 24. N 8. P. 3406–3419.
14. *Hadwiger L.A.* Multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype // *Plant Sci.* 2013. Vol. 208. P. 42–49.
15. *Artemov A.V., Samuilov V.D.* Effect of polyelectrolytes on serine proteinase secretion by *Bacillus subtilis* // *FEBS Lett.* 1990. Vol. 262. N 1. P. 33–35.
16. *Prevette L.E., Mullen D.G., Banaszak Holl M.M.* Polycation-induced cell membrane permeability does not enhance cellular uptake or expression efficiency of delivered DNA // *Mol. Pharm.* 2010. Vol. 7. N 3. P. 870–883.
17. *Young D.H., Kühle H., Kauss H.* Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured Glycine max and Phaseolus vulgaris cells // *Plant Physiol.* 1982. Vol. 70. N 5. P. 1449–1454.
18. *Kiselevsky D.B., Frolova O.Y., Solovyev A.G., Dorokhov Y.L., Morozov S.Y., Samuilov V.D.* Plant cell death caused by fungal, bacterial, and viral elicitors: protective effect of mitochondria-targeted quinones // *Biochemistry (Mosc.).* 2014. Vol. 79. N 12. P. 1322–1332.
19. *Rodi P.M., Bocco Gianello M.D., Corregido M.C., Gennaro A.M.* Comparative study of the interaction of CHAPS and Triton X-100 with the erythrocyte membrane // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. Vol. 1838. N 3. P. 859–866.
20. *Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G., Gorczyca W., Hotz M.A., Lassota P., Traganos F.* Features of apoptotic cells measured by flow cytometry // *Cytometry.* 1992. Vol. 13. N 8. P. 795–808.
21. *Luttge U., Higinbotham N.* Transport in plants. N.Y.: Springer Verlag, 1979. 468 pp.
22. *Iriti M., Sironi M., Gomasasca S., Casazza A.P., Soave C., Faoro F.* Cell death-mediated antiviral effect of chitosan in tobacco // *Plant Physiol. Biochem.* 2006. Vol. 44. N 11–12. P. 893–900.
23. *Zhang X., Li X.H., Ma X., Wang Z.H., Lu S., Guo Y.L.* Redox-induced apoptosis of human oocytes in resting follicles in vitro // *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2006. Vol. 13. N 6. P. 451–458.
24. *Balhorn R.* The protamine family of sperm nuclear proteins // *Genome Biol.* 2007. Vol. 8. N 9: 227.

25. Vuorimaa-Laukkanen E., Lisitsyna E.S., Ketola T.M., Morin-Pickardat E., Liang H., Hanzlíková M., Yliperttula M. core-shell dynamics of polyethyleneimine and poly(l-lysine) DNA polyplexes // Eur. J. Pharm. Sci. 2017. Vol. 103. P. 122–127.

Поступила в редакцию 28.02.2019 г.

После доработки 31.05.2019 г.

Принята в печать 20.06.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

PERMEABILITY OF THE PLASMA MEMBRANE FOR PROPIDIUM IODIDE AND DESTRUCTION OF CELL NUCLEI IN THE EPIDERMIS OF PEA LEAVES: THE EFFECT OF POLYELECTROLYTES AND DETERGENTS

D.B. Kiselevsky*, V.D. Samuilov

*Department of Immunology, School of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: dkiselevs@mail.ru

Damage to the plasma membrane (PM) of cells in pea leaf epidermis, determined by its permeability to propidium iodide (PI), which binds to DNA of cell nuclei, and programmed cell death (PCD) detected by the destruction of cell nuclei was investigated. PM of the epidermal cells in the isolated epidermis was permeable to PI (it stained their nuclei). PM of the guard cells did not allow PI to pass through. KCN, an inducer of PCD, caused the destruction of the both epidermal and guard cell nuclei. KCN-Induced destruction of guard cell nuclei was accompanied by the penetration of PI into the cells. The polycation chitosan at a concentration of 0.1 mg/ml caused the destruction of the epidermal cell nuclei, but at a concentration of 1 mg/ml, the permeability of the guard cell PM for PI staining their nuclei was induced. Other polycations (cytochrome *c*, polylysine, polyethylenimine and protamine) also caused staining of the guard cell nuclei by PI. Polyanions (polyacrylic acid, dextran and heparin) initiated the destruction of cell nuclei, which was accompanied by the penetration of PI into cells. Detergents Triton X-100 and lauryldimethylamine-N-oxide produced the permeability of the guard cell PM for PI and prevented the destruction of the nuclei that was induced by KCN. Treatment of the epidermis with Triton X-100 (for 2 h with its subsequent washing) increased the destruction of the guard cell nuclei that was caused by KCN. Polycations polyethyleneimine and protamine were prevented, while chitosan, cytochrome *c*, and polylysine, on the contrary, enhanced KCN-induced destruction of the guard cell nuclei. The data obtained shows that the destruction of cell nuclei upon induction of cell death with KCN or polyanions is accompanied by damage to PM (producing its permeability for PI). Damage to PM caused by detergents or polycations prior to cell treatment by KCN, can prevent or, on the contrary, intensify the destruction of cell nuclei.

Keywords: *programmed cell death, plasma membrane, detergents, polyelectrolytes, chitosan, propidium iodide*

Сведения об авторах

Киселевский Дмитрий Борисович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: dkiselevs@mail.ru

Самуилов Виталий Дмитриевич — докт. биол. наук, проф., гл. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: vdsamuilov@mail.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.222.2:579.69

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОГО ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА *BACILLUS MOBILIS* 34Т ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВЫ ОТ 2,4,5-ТРИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

В.В. Коробов*, Е.Ю. Журенко, Н.В. Жарикова, Т.Р. Ясаков, Т.В. Маркушева

Уфимский Институт биологии, Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Россия,
450054, г. Уфа, просп. Октября, д. 69

*e-mail: vacikk@mail.ru

Описан новый штамм-деструктор 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4,5-Т), выделенный из пробы почвы предприятия, которое являлось крупнейшим производителем гербицидов в России. Идентификация штамма проведена с учетом культурально-морфологических, морфометрических, физиолого-биохимических признаков, а также результатов сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК. Выделенный штамм определен как *Bacillus mobilis* 34Т. Исследован рост периодической культуры *B. mobilis* 34Т в условиях использования 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л в качестве источника углерода и энергии. Содержание 2,4,5-Т в культуральной жидкости в течение первых суток снижалось на 29%, к 9-м сут — на 62% от начального уровня. Штамм *B. mobilis* 34Т был применен для биологической очистки почвы, загрязненной 2,4,5-Т. Степень очистки составляла на 5-е сут 41%, на 10-е сут — 52% и на 15 — 20-е сутки культивирования — 58%.

Ключевые слова: *Bacillus mobilis*, штамм-деструктор, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота, утилизация, гербициды, почва

Присутствие в биосфере хлорированных ароматических производных представляет существенную опасность для окружающей среды [1]. 2,4,5-Трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т), обладающая токсичными и канцерогенными свойствами, в сочетании с другими гербицидами широко применялась при выращивании зерновых культур, использовалась на пастбищах и газонах, а также в лесном хозяйстве. Агентство по защите окружающей среды США (USEPA) включило 2,4,5-Т в группу токсичных и ассоциированных с риском для здоровья человека веществ. 2,4,5-Т имеет тенденцию к накоплению в тканях, способна к кумулятивному токсическому воздействию на теплокровные организмы. Одной из причин такого положения является наличие в молекуле 2,4,5-Т галогенуглеродных связей, которые трудно расщепляются в клетках живых систем.

Известно, что микроорганизмы играют важную роль в утилизации органических загрязнителей. Современный этап исследований биологического воздействия на ксенобиотики характеризуется выраженным практическим интересом к выделению и изучению новых бакте-

риальных штаммов-деструкторов. Это связано с их высокой генетической пластичностью и, как следствие, высокой приспособляемостью к изменяющимся условиям окружающей среды. Благодаря этому бактерии приобретают способность использовать в качестве источников питания и энергии разнообразные производные, в том числе — токсичные по отношению к про- и эукариотам. Число описанных в литературе бактериальных культур, способных метаболизировать 2,4,5-Т, ограничено. Для вида *B. mobilis* свойство деградации 2,4,5-Т ранее не было установлено.

Материалы и методы

Штамм *B. mobilis* 34Т был выделен из пробы почвы расположенного в г. Уфе (Республика Башкортостан) вблизи предприятия, которое являлось крупнейшим производителем гербицидов в России. Тип почвы — аллювиальная с тяжелым механическим составом (легкие глины и тяжелые суглинки).

Выделение и идентификация штамма по признакам морфологической, морфометрической, физиологической и биохимической дифференциации.

Выделение чистой культуры *B. mobilis* 34Т было проведено на селективной среде следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,6; KH_2PO_4 – 2,4; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 5,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0. В качестве единственного источника углерода и энергии в среду добавляли 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л. Физиолого-биохимические и культуральные свойства штамма определяли методами, описанными ранее [2]. Морфометрические и морфологические характеристики были определены с помощью атомно-силовой микроскопии на сканирующем зондовом микроскопе Solver PRO-M (NT-MDT, Россия) [3].

Секвенирование генов, кодирующих 16S рРНК, сравнение последовательностей и филогенетический анализ. Выделение геномной ДНК штамма 34Т, амплификацию полной последовательности гена 16S рРНК и дальнейшее секвенирование проводили по методикам, описанным ранее [4]. Филогенетический анализ также был проведен по описанной ранее методике [5]. Штамм депонирован в международную базу данных GenBank под номером MK300727.

Рост культуры в жидкой питательной среде и его анализ. Посевной материал получали выращиванием бактерий в разведенном в 8 раз мясопептонном бульоне при температуре 30°C. Далее культуру в концентрации $5,4 \cdot 10^8$ колониеобразующих единиц (КОЕ) засеивали в количестве 1 мл в жидкую среду объемом 100 мл следующего состава (г/л): NH_4Cl – 1; K_2HPO_4 – 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; ZnSO_4 – 0,008; 2,4,5-Т – 0,1 и инкубировали в термостатируемом орбитальном встряхивателе УВМТ-12-250 («Элион», СССР) при 120 об./мин. Контроль роста осуществляли с использованием фотокolorиметра КФК-2 («ЗОМЗ», Россия) по изменению оптической плотности клеточной суспензии при длине волны 590 нм.

Определение концентрации 2,4,5-Т в культуральной жидкости. Определение проводили согласно методам, описанным ранее [2]. Для анализов отбирали по 10 мл культуральной жидкости на 3-и, 5-е и 7-е сут инкубации штамма. Пробы освобождали от клеток штамма центрифугированием (3630g, 30 мин). Далее жидкость подкисляли до pH 2 добавлением 1 н соляной кислоты. В каждую пробу добавляли в качестве стандарта 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) до конечной концентрации 100 мг/л. Затем из проб проводили 3-кратную экстракцию 2,4,5-Т и 2,4-Д равными объемами хлороформа. После экстракции хлороформ удаляли отгонкой на вакуумном ротационном испарителе. Экстракты 2,4,5-Т и 2,4-Д переводили в гексан и фракционировали методом тонкослой-

ной хроматографии. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинах силуфол UV-254 («Kavalier», Чехия). Сканирование образцов проводили при длине волны 280 нм в камере Chromoscan 201 («Jouco-Loebl», Великобритания). Содержание 2,4,5-Т определяли по калибровочному графику для чистого стандарта 2,4,5-Т.

Определение концентрации 2,4,5-Т в почве. В модельном эксперименте использовали почву экологически чистого Зилаирского района Республики Башкортостан. Тип почвы – горно-лесная темно-серая, с тяжелосуглинистым и глинистым механическим составом. Для исследований в почву вносили 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/кг. 20 г почвы помещали в стеклянные стаканы объемом 100 мл. Для проведения процесса биологической очистки в почву вносили посевной материал культуры *B. mobilis* 34Т из расчета 105–106 КОЕ на 1 г почвы. Культивирование проводили при 24–27°C в течение 21 сут. На 5-е, 10-е, 15-е и 20-е сут инкубации проводили отбор почвы в количестве 2 г. К каждой пробе добавляли по 10 мл дистиллированной воды. Пробы помещали на 20 мин во встряхиватель УВМТ-12-250 («Элион», СССР). Данную процедуру повторяли 3 раза. Водную вытяжку объединяли и осветляли центрифугированием (3630g, 30 мин). Тонкослойную хроматографию и анализ содержания 2,4,5-Т проводили так, как описано выше для определения 2,4,5-Т в культуральной жидкости.

Проведение экспериментов осуществляли в 3-кратной повторности, данные обрабатывали с помощью программы ORIGIN SRO 7.0. В качестве достоверных рассматривали различия между выборочными средними при 5%-ном уровне значимости.

Результаты и обсуждение

Идентификация штамма *B. mobilis* 34Т. В ходе определения основных морфологических и физиолого-биохимических признаков культуры 34Т было показано, что эта культура образует на агаре беловатые непрозрачные мелко складчатые колонии. Клетки имели положительную окраску по Граму. Для штамма был характерен аэробный рост, оптимальный рост наблюдался в диапазоне температур от +22°C до +41°C и значениях pH среды, близких к нейтральным (6,8). Культура не использовала в качестве источника углерода цитрат, пропионат, фенилаланин, не наблюдалось образования кислоты из арабинозы, ксилозы, маннита, газа из глюкозы, а при ассимиляции глюкозы среда подкислялась. Бактерии осуществляли гидролиз желатина, проявляли невысокую активность в отноше-

нии крахмала и казеина, обладали каталазной, лецитиназной активностью, осуществляли редукцию NO_3^- . В присутствии 2% NaCl наблюдался небольшой рост, а в диапазоне концентрации от 5 до 10% NaCl рост бактерий отсутствовал.

Изучение морфо-популяционных особенно-

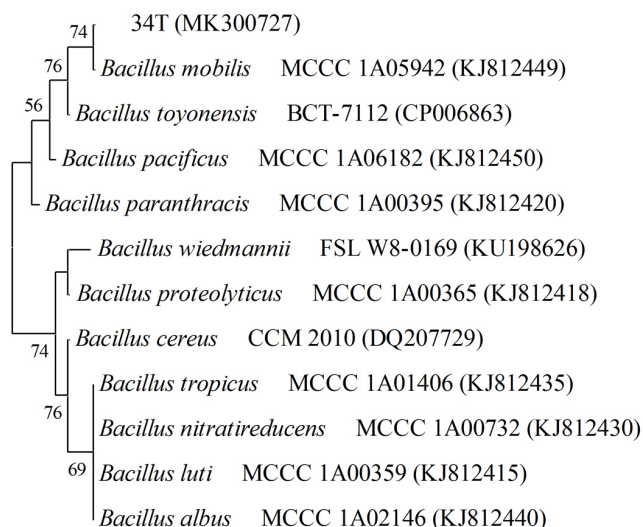


Рис. 1. Филогенетическое древо, показывающее положение штамма 34Т (МК300727) и близких ему типовых штаммов группы *Bacillus cereus* (построено методом Neighbor-Joining). Цифрами указана достоверность ветвления, рассчитанная с помощью «bootstrap»-анализа (значимыми признаются величины больше 50). Масштаб отражает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 10000 нуклеотидов. В скобках указаны номера в GenBank

стей клеточной суспензии штамма 34Т показало, что клетки имеют крупные размеры, варьирующие в пределах 0,63/1,47–0,77/2,47 мкм, также обнаруживались единичные образования округлой и овальной формы размерами 0,4–0,4/0,7 мкм, которые представляли собой споры этой культуры. Более старые микробы имели несколько искривленную форму и более рыхлую цитоплазму, а их размеры примерно на 10% превышали размеры молодых клеток.

Анализ филогенетического древа, построенного методом Neighbor-Joining [6] показал, что исследуемый штамм 34Т принадлежит к группе *Bacillus cereus* [7]. Уровень идентичности между последовательностями генов 16S рРНК исследуемого штамма (1509 п.н.) и типовых штаммов группы *Bacillus cereus* составил 99,46–99,93%. Филогенетически наиболее близким к исследуемому штамму был типовой представитель вида *Bacillus mobilis* – штамм MCCC 1A05942^T (=KCTC 33717^T=LMG 28877^T) (KJ812449), который образовывал с ним единый кластер. Уровень идентичности между ними составил

99,93%. Таким образом, согласно существующим в настоящее время представлениям [8], штамм 34Т принадлежит виду *Bacillus mobilis*.

С учетом культурально-морфологических, физиолого-биохимических свойств и по молекулярным критериям штамм идентифицирован как *Bacillus mobilis* 34Т (рис. 1).

Субстратная специфичность штамма *B. mobilis* 34Т. При использовании 2,4,5-Т в качестве источника углерода и энергии изменение значений оптической плотности клеточной суспензии *B. mobilis* 34Т отмечалось после невыраженной лаг-фазы. Максимальное значение оптической плотности наблюдалось на 3-е сут инкубации и составляло 0,79 оптических единиц (о.е.), затем культура заканчивала свой рост и переходила в стационарную фазу. В течение первых суток культивирования концентрация 2,4,5-Т снижалась на 29%, к 9-м сут инкубации – на 62% от начального уровня (рис. 2).

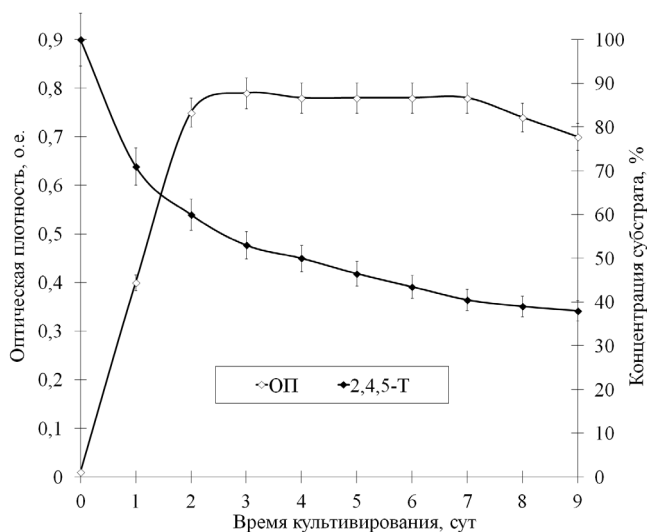


Рис. 2. Графики зависимости значений оптической плотности клеточной суспензии (ОП₅₉₀) и концентрации 2,4,5-Т, используемой в качестве единственного источника углерода и энергии, от времени инкубации штамма *B. mobilis* 34Т в периодической культуре

Использование штамма *B. mobilis* 34Т для очистки почвы от 2,4,5-Т. Штамм *B. mobilis* 34Т был применен для биологической очистки почвы, загрязненной 2,4,5-Т в концентрации 100 мг/кг. Уменьшение концентрации 2,4,5-Т в почве происходило в течение 20 сут. Степень очистки, достигаемая при использовании данной культуры, составляла 41% на 5-е сут, 52% на 10-е сут и 58% – на 15–20-е сут культивирования.

В литературе описано несколько штаммов, принимающих участие в биологической дегра-

дации 2,4,5-Т. Штамм *Pseudomonas cepacia* AC1100 при оптимальной температуре и влажности разлагал до 95% 2,4,5-Т при концентрации 1 мг/г почвы в течение 7 сут [9]. Штамм *Burkholderia* sp JR7B3 минерализовывал 2,4,5-Т в концентрации 1 мг/мл в присутствии 0,01% дрожжевого экстракта [10].

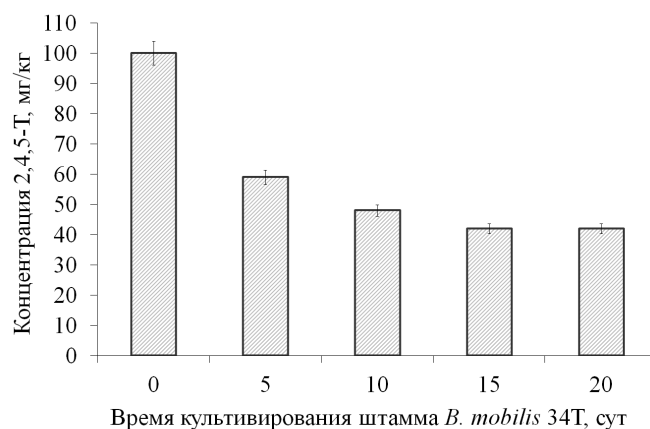


Рис. 3. Зависимость снижения концентрации 2,4,5-Т в почве от времени инкубации штамма *B. mobilis* 34Т

Ранее нами было выделено и описано несколько культур, способных использовать 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии. Культура *Gluconobacter oxydans* 2Т

утилизировала 81% 2,4,5-Т в периодической культуре и 67% в почве при концентрации 2,4,5-Т 100 мг/кг. [11]. Штамм *Rhodococcus rubropertinctus* 5D утилизировал около 40% 2,4,5-Т на 8-е сут в жидкой среде культивирования [12]. Показана принципиальная возможность накопления биомассы культурами *B. subtilis* CH93F и *B. simplex* CM53F при использовании 2,4,5-Т в качестве источника питания.

Принимая во внимание приведенные данные, следует отметить, что для представителей *B. mobilis* ранее не была установлена возможность ассимиляции 2,4,5-Т. Мы показали, что штамм *B. mobilis* 34Т способен использовать 2,4,5-Т в качестве источника углерода и энергии в водной среде и почве. Выявленное свойство позволяет применять данный штамм для ремедиации окружающей среды.

В работе было использовано оборудование регионального центра коллективного пользования «Агидель» Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

Работа выполнена в рамках государственного задания (номер гос. регистрации — АААА-А18-118022190098-9).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sastry B.V., Janson V.E., Clark C.P., Owens L.K. Cellular toxicity of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid: formation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetylcholine // Cell Mol. Biol. 1997. Vol. 43. N 4. P. 549–557.
2. Korobov V.V., Zhurenko E.Yu., Galkin E.G., Zharikova N.V., Iasakov T.R., Starikov S.N., Sagitova A.I., Markusheva T.V. Cellulosimikrobium sp. Strain NPZ-121, a Degradar of 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid // Microbiology. 2018. Vol. 87. N 1. P. 147–150.
3. Bolshakova A.V., Kiselyova O.I., Yaminsky I.V. Microbial surfaces investigated using atomic force microscopy // Biotechnol. Prog. 2004. Vol. 20. N 6. P. 1615–1622.
4. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Bumazhkin B.K., Patutina E.O., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Sagitova A.I., Kuznetsov B.B., Markusheva T.V. Isolation and sequence analysis of pCS36-4CPA, a small plasmid from *Citrobacter* sp. 36-4CPA // Saudi J. Biol. Sci. 2018. Vol. 25. N 4. P. 660–671.
5. Korobov V.V., Zhurenko E.I., Zharikova N.V., Iasakov T.R., Markusheva T.V. Possibility of using phenol- and 2,4-dichlorophenol-degrading strain, *Rhodococcus erythropolis* 17S, for treatment of industrial wastewater // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 4. P. 235–240.
6. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. N 4. P. 406–425.
7. Liu Y., Du J., Lai Q., Zeng R., Ye D., Xu J., Shao Z. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. Vol. 67. N 8. P. 2499–2508.
8. Stackebrandt E., Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards // Microbiol. Today. 2006. Vol. 33. N 4. P. 152–155.
9. Chatterjee D.K., Kilbane J.J., Chakrabarty A.M. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in soil by a pure culture of *Pseudomonas cepacia* // Appl. Environ. Microbiol. 1982. Vol. 44. N 2. P. 514–516.
10. Rice J.F., Menn F.M., Hay A.G., Sanseverino J., Sayler G.S. Natural selection for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid mineralizing

bacteria in agent orange contaminated soil // Biodegradation. 2005. Vol. 16. N 6. P. 501–512.

11. Zhurenko E.Yu., Markusheva T.V., Galkin E.G., Korobov V.V., Zharikova N.V., Gafiyatova L.R. *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T Degrades 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid // Biotechnol. Russ. 2003. N 6. P. 75–80.

12. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Маркушева

Т.В., Абрамов С.Н. Выделение и анализ биодegradационного потенциала нового природного штамма-деструктора хлорфеноксикислот рода *Rhodococcus* // Изв. Самар. Науч. центра РАН. 2011. Т. 13. № 5–2. С. 169–171.

Поступила в редакцию 14.03.2019 г.

После доработки 08.05.2019 г.

Принята в печать 20.06.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

APPLICATION OF THE NEW DEGRADER STRAIN BACILLUS MOBILIS 34T FOR SOIL CLEARING FROM 2,4,5-TRICHLOROPHENOXYACETIC ACID

V.V. Korobov*, E.I. Zhurenko, N.V. Zharikova, T.R. Iasakov, T.V. Markusheva

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences,
prospect Oktyabrya 69, Ufa, 450054, Russia

*e-mail: vacikk@mail.ru

The 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)-degrading strain *Bacillus mobilis* 34T isolated from the soil sample of the largest producer of herbicides in Russia was described. The strain was identified as *Bacillus mobilis* 34T according to the cultural, morphological, morphometric, physiological, biochemical, features as well as the results of the comparative analysis of the 16S rRNA gene sequence. The growth of *B. mobilis* 34T in the batch culture with using 2,4,5-T as a sole source of carbon and energy was studied. It was showed that 2,4,5-T content was reduced from the initial level by 29% and 62% during the first and ninth day, respectively. The strain was used for the treatment of a soil contaminated with 2,4,5-T. The decontamination degree was 41%, 52%, 58% on the 5th, 10th and 15–20st days of cultivation, respectively.

Keywords: *Bacillus mobilis*, degrader strain, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, utilization, herbicides, soil

Сведения об авторах

Коробов Владислав Викторович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: vacikk@mail.ru

Журенко Евгения Юрьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: zhurenkoe@gmail.ru

Жарикова Наталья Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: puzzle111@yandex.ru

Ясаков Тимур Рамилевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: iasakov@anrb.ru

Маркушева Татьяна Вячеславовна — докт. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной микробиологии Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: tvmark@anrb.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.088.1

СВЯЗЫВАНИЕ PARP1 С РАЗРЫВАМИ И ШПИЛЬКАМИ НА ДНК ИЗМЕНЯЕТ СТРУКТУРУ НУКЛЕОСОМ

Н.В. Малюченко^{1,*}, Е.Ю. Котова², М.П. Кирпичников^{1,3}, В.М. Студитский^{1,2},
А.В. Феофанов^{1,3}

¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA;

³Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10
*e-mail: mal_nat@mail.ru

Поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 (PARP1) участвует в процессах репарации, репликации, транскрипции ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза. Участие PARP1 в репарации определяется способностью фермента к взаимодействиям с различными дефектами и неканоническими структурами ДНК с последующим полиАДФ-рибозилированием белков, находящихся рядом. Ранее на примере мононуклеосом, имеющих один выступающий конец ДНК, моделирующий двуцепочечный разрыв ДНК вблизи кор-нуклеосом, нами была обнаружена способность PARP1 вызывать структурные перестройки в нуклеосомах в отсутствие НАД⁺. В настоящей работе мы показали, что PARP1 вызывает подобные структурные перестройки в нуклеосомах как в случае нуклеосом с концами ДНК, отстоящими от коровой области на 20 п.н., так и в случае модификации этих концов шпильками. Во всех исследованных вариантах нуклеосом PARP1 вызывает изменение укладки ДНК на октамере гистонов, сопровождающееся увеличением расстояния между соседними витками ДНК. Эти PARP1-опосредованные изменения в структуре нуклеосом предположительно способствуют деконденсации хроматина и облегчают доступ ферментов репарации к повреждениям ДНК.

Ключевые слова: поли(АДФ-рибоза)полимераза 1, нуклеосома, флуоресценция, перенос энергии, микроскопия, шпильки ДНК

Поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 (PARP1) – второй по представленности в ядре белок после гистонов [1], который относится к семейству поли(АДФ-рибозил)-трансфераз [2]. PARP1 состоит из шести основных доменов, которые соединены между собой гибкими линкерами [3, 4]. PARP1 участвует в репарации ДНК, поскольку входящие в его состав так называемые цинковые пальцы распознают и связывают различные повреждения ДНК: одно- и двуцепочечные разрывы, апуриновые сайты и неканонические структуры ДНК, такие как шпильки и крестообразные структуры [5, 6]. PARP1 первым из белков рекрутируется к месту повреждения ДНК [7, 8]. Взаимодействие с ДНК приводит к конформационным изменениям доменов PARP1, вызывая активацию фермента и НАД⁺-зависимое поли(АДФ-рибозил)ирование белков.

Установлено, что активация PARP1 способствует деконденсации хроматина в месте разрыва и облегчает доступ ферментов репарации к повреждениям ДНК. При этом поли(АДФ-рибозил)ированные аминокислотные остатки привлекают факторы, воздействующие на структуру хроматина и участвующие в репарации [6]. Недавно появились данные о нуклеосом-ремоделирующем действии PARP1, которое не связано с его ферментативной активностью. В частности, было обнаружено, что образование комплекса PARP1 с нуклеосомой в отсутствие НАД⁺ обратимо меняет укладку ДНК на октамере гистонов, значительно увеличивая расстояние между соседними витками ДНК [9]. Установлено, что связывание PARP1 с нуклеосомами в отсутствие НАД⁺ облегчает взаимодействие пионерных транскрипционных

факторов с сайтами нуклеосомной ДНК, которые в обычном состоянии экранированы октамером гистонов [10]. Поскольку управление структурными перестройками нуклеосомы является одним из основных механизмов регуляции ядерных процессов транскрипции, репликации и репарации ДНК, новая нуклеосом-ремоделирующая активность PARP1, не зависящая от поли(АДФ-рибозил)ирования, требует детального исследования.

Ранее PARP1-индуцированные структурные изменения нуклеосом были обнаружены нами при изучении мононуклеосом с одним выступающим (линкерным) участком ДНК [9]. Эти изменения наблюдались при высокой концентрации PARP1 (100 нМ) и могли быть вызваны связыванием фермента с концом ДНК на границе коровой области нуклеосомы (рисунок, А). В настоящей работе особенности ремоделирующего действия PARP1 исследованы на примере мононуклеосом с двумя участками лин-

керной ДНК длиной 20 п.н. со шпильками на обоих концах ДНК и без них (рисунок, Б, В). Исследования конформации нуклеосом проводили методом флуоресцентной микроскопии одиночных комплексов на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии (single particle Förster Resonance Energy Transfer microscopy, далее — spFRET-микроскопия), для чего в нуклеосомную ДНК вводили две флуоресцентные метки (рисунок, А), образующие донор-акцепторную пару и позволяющие выявлять изменение укладки соседних витков ДНК на октамере гистонов, как это показано ранее [9, 11, 12].

Материалы и методы

В работе использовали: Taq-ДНК-полимеразу, наборы для очистки ПЦР-фрагментов (ПЦР — полимеразная цепная реакция) и экстракции ДНК из геля (Евроген, РФ); ферменты

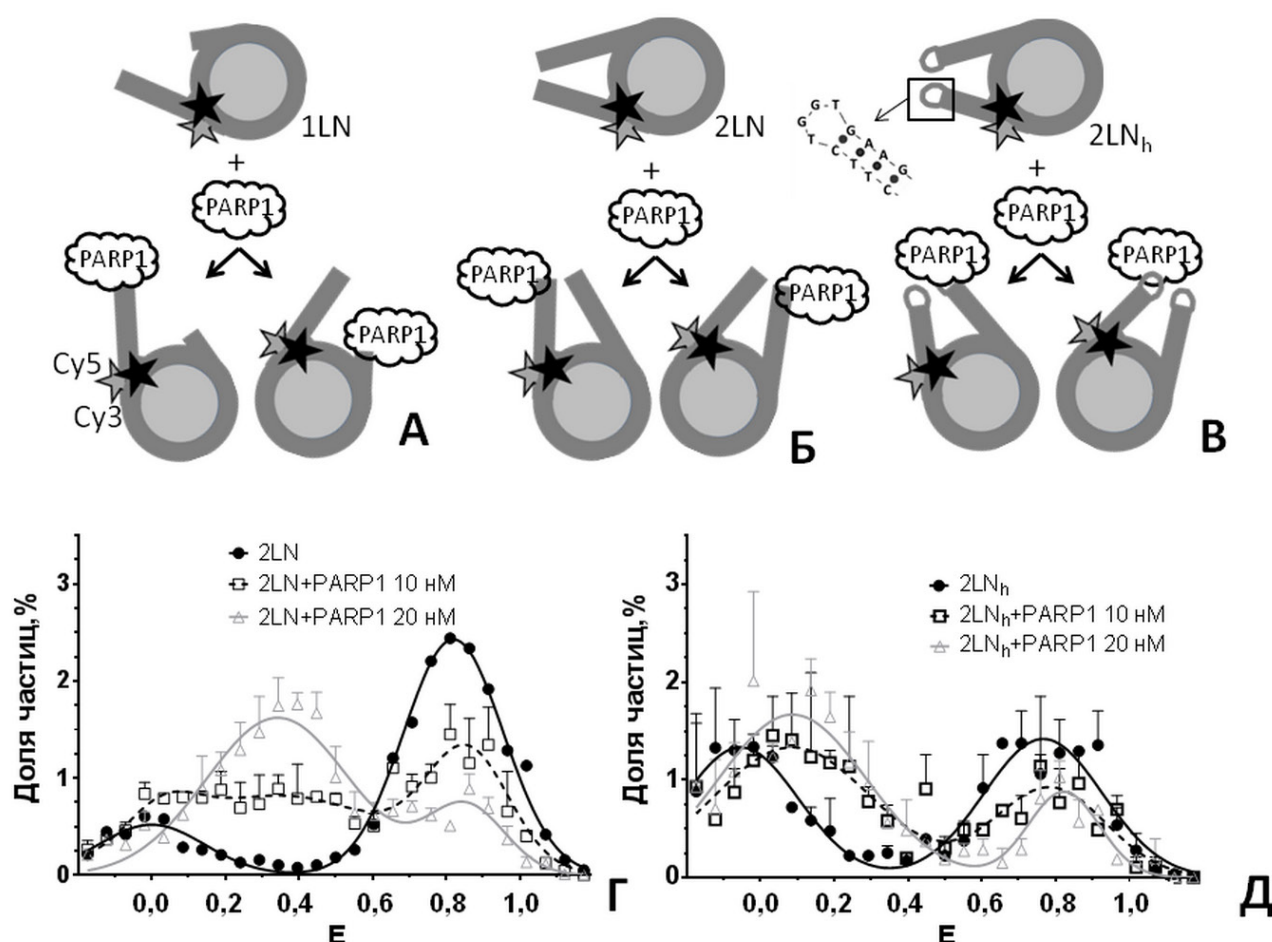


Рисунок. Влияние PARP1 на структуру нуклеосом. А–В — схематическое изображение структур мононуклеосом 1LN, 2LN и 2LN_h, отличающихся длиной линкерных участков ДНК и наличием/отсутствием шпилек на концах ДНК, а также предполагаемых комплексов этих нуклеосом с PARP1. Звездочками отмечено положение флуоресцентных меток Cy3 и Cy5. Г, Д — частотные распределения нуклеосом 2LN (Г) и 2LN_h (Д) и их комплексов с PARP1 по величине эффективности FRET (Е), измеренные методом spFRET-микроскопии. Представлены средние ± стандартные ошибки среднего значения рассчитанных величин

рестрикции, T7-экзонуклеазу и ДНК-лигазу фага T4 (New England Biolabs, США).

Флуоресцентно-меченые ДНК-матрицы длиной 187 п.н. с нуклеосом-позиционирующей последовательностью s603 получали при помощи ПЦР с использованием следующих праймеров, меченных флуорофорами Cy3 и Cy5 (Lumiprobe, РФ):

2LN_P_forward 5'-CAAGCGACACCGGCAC TGGGCCCCGGTTCGCGC[Cy3-dT]CCCCGCCTT CCGTGTGTTGTCTCTCTCGGGCGT-3';
2LN_P_reverse GAACCATGATGGGCACTGGG TACCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGG AGGGCCTCTTCAACATCGATGCACGG[Cy5-dT]GGTTAG-3.

Использование данной пары праймеров обеспечивало введение флуоресцентных меток Cy3 и Cy5 соответственно в положения 33 и 111 п.н. от начала ДНК (13 и 91 п.н. относительно входа ДНК в нуклеосому).

Очищенный ПЦР-продукт обрабатывали TspR1-рестриктазой (3 ч, 65°C), очищали и лигировали с образующим шпильчатую структуру и содержащим TspR1-сайт олигонуклеотидом GCTGAGCTTCTGGTGAAGCTCAGCGGCACT GGG (12 ч, 16°C). Продукт очищали и нелигированные фрагменты удаляли с помощью T7-экзонуклеазы в течение часа при 25°C. Каждый этап обработки ферментами сопровождался очисткой получившихся продуктов и их проверкой электрофорезом в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с 8 М мочевиной. В результате получали матрицу со шпильками на концах ДНК, которую использовали для сборки нуклеосом. Альтернативно использовали аналогичную ДНК без маскированных концов. Для сборки нуклеосом использовали хроматин без гистона H1, который выделяли из эритроцитов цыплят, как описано ранее [13]. Нуклеосомы собирали на ДНК-матрицах с помощью ступенчатого диализа против раствора NaCl в уменьшающейся концентрации при 4°C по протоколу, описанному ранее [13]. Далее моонуклеосомы очищали от избытка донорного хроматина и неспецифических продуктов реакции с помощью препаративного электрофореза в 4%-ном ПААГ, в буфере 10 mM HEPES-NaOH (Sigma-Aldrich, США, pH 8,0); 0,2 mM ЭДТА. Перед нанесением проб на гель проводили префорез (150 В, 1,5 ч, 4°C). Анализ нуклеосом в геле выполняли на приборе Typhoon Trio (GE Healthcare, США). По полученному изображению вырезалась целевая полоса ПААГ с моонуклеосомами и измельчалась. Нуклеосомы элюировали из геля буфером, содержащим 10 mM HEPES-NaOH (pH 8,0), 0,2 mM ЭДТА, 200 мкг/мл бычьего сывороточного

альбумина, и хранили при 4°C. Человеческий рекомбинантный PARP1 экспрессировали в *E. coli*, очищали по методике, описанной ранее [14] и хранили при -80°C.

Измерение и анализ одиночных нуклеосом, а также их комплексов с PARP1 проводили в растворе, содержащем 150 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂ и 1 mM β-меркаптоэтанол, по методике, описанной ранее [15, 16].

Измерения проводили при помощи конфокального микроскопа LSM710-Confocor 3 (Carl Zeiss, Германия) в силиконовых лунках на покровном стекле, используя водо-иммерсионный объектив с 40-кратным увеличением С-Apochromat (числовая апертура - 1,2). Комплексы формировали, инкубируя нуклеосомы (1 nM) с PARP1 (10 или 20 nM) в течение 25 мин при 22°C.

Измеренные величины интенсивности флуоресценции Cy3 и Cy5 (I_3 и I_5) в составе одиночных нуклеосом корректировали на величину фона и пересчитывали в коэффициент близости (E), используя уравнение

$$E = (I_5 - 0,19 \times I_3) / (I_5 + 0,81 \times I_3),$$

где коэффициенты 0,19 и 0,81 обеспечивают учет частичного перекрытия спектров флуоресценции Cy3 и Cy5 в области 635–800 нм [15, 16]. Коэффициент близости E — это аналог эффективности FRET без учета поправок на квантовые выходы флуорофоров и отличия в чувствительности прибора в областях испускания флуоресценции Cy3 и Cy5. Результаты расчетов представляли в виде гистограмм распределения нуклеосом и их комплексов с PARP1 по величине E . Данные были получены в нескольких независимых экспериментах, а размеры выборок составляли не менее 3000 нуклеосом. Представленные на гистограммах зависимости описывали в виде суперпозиции нескольких нормальных распределений (полос Гауссовой формы), соответствующих различным структурным состояниям нуклеосом, и определяли долю нуклеосом в каждом из этих состояний.

Результаты и их обсуждение

Для изучения структурных перестроек в коровой области нуклеосом при их взаимодействии с PARP1 были сконструированы моонуклеосомы 2LN, октамер гистонов в которых получали из хроматина эритроцитов цыплят, а в основу ДНК-матрицы положена нуклеосом-позиционирующая последовательность 603 длиной 147 п.н. Эта последовательность была дополнена с обеих сторон участками линкерной ДНК длиной по 20 п.н. (рисунк, Б). В нуклеосомах 2LN оба конца ДНК (потенциальные сайты связывания PARP1 [5, 6]) расположены на зна-

чительном расстоянии от кор-нуклеосом, в отличие от ранее исследованных нуклеосом 1LN (рисунок, А), в которых один конец ДНК находился непосредственно у границы кор-нуклеосомы, а другой — на расстоянии 20 п.н. от нее [9]. Еще в одном варианте моонуклеосом ($2LN_h$, рисунок, В) на концы линкерной ДНК были введены короткие шпильки, которые, как полагают, способны модулировать образование комплексов с PARP1 [5, 6]. Во всех типах нуклеосом донор-акцепторная пара флуорофоров находилась в одном и том же участке кор-нуклеосом.

Исследования, проведенные методом spFRET-микроскопии, показали, что $2LN$ и $2LN_h$ представлены в растворе двумя субпопуляциями, которым соответствуют два нормальных (гауссовых) распределения по величине E с максимумами в области высоких и низких значений E (рисунок, Г, Д). Основная субпопуляция $2LN$ ($83 \pm 3\%$ нуклеосом, максимум $E = 0,83 \pm 0,02$) соответствует интактным нуклеосомам с плотной укладкой нуклеосомной ДНК на октамере гистонов, а минорная субпопуляция $2LN$ ($17 \pm 4\%$ нуклеосом, $E = 0,02 \pm 0,01$) соответствует нуклеосомам с нарушенной укладкой нуклеосомной ДНК [9]. Соответствующие субпопуляции $2LN_h$ характеризуются максимумами с $E = 0,77 \pm 0,03$ и $0,01 \pm 0,01$, а доли нуклеосом в них составляют соответственно 57 ± 7 и $43 \pm 6\%$ (рисунок, Д). Субпопуляция с низкими значениями E возникает в исследуемых образцах из-за потери гистонов и дестабилизации структуры нуклеосомной ДНК в разбавленных растворах, а также вследствие так называемого «дыхания» нуклеосом, то есть временного спонтанного отворачивания небольшого участка ДНК от октамера гистонов в области входа ДНК в нуклеосому [17]. Первый фактор, по-видимому, является основной причиной большей субпопуляции $2LN_h$ с $E = 0,01$ по сравнению с $2LN$: дополнительные очистки после лигирования шпилек приводят к значительному уменьшению концентрации $2LN_h$ по сравнению с исходными $2LN$.

Обнаружено, что PARP1, образуя комплексы с $2LN$, вызывает концентрационно-зависимые структурные изменения в коровой области нуклеосом, которые регистрируются методом spFRET-микроскопии как появление новой субпопуляции нуклеосом с максимумом нормального распределения с $E = 0,35 \pm 0,04$ (рисунок, Г). Доля таких комплексов составляет $32 \pm 7\%$ при 10 нМ фермента и возрастает до $64 \pm 6\%$ при 20 нМ PARP1.

Не менее эффективно PARP1 образует комплексы и изменяет структуру $2LN_h$ (рисунок,

Д). Комплексы PARP1 с $2LN_h$ имеют максимум распределения по величине E , равный $E = 0,23 \pm 0,03$, а их доля составляет 33 ± 5 и $41 \pm 5\%$ соответственно при 10 и 20 нМ фермента.

Уменьшение величины E в комплексах свидетельствует об изменении укладки ДНК на октамере гистонов, сопровождающемся увеличением расстояния между соседними витками ДНК. Отметим, что для $2LN$ и $2LN_h$ ремоделирующее действие PARP1 наблюдается в наномолярном диапазоне концентраций фермента.

Ранее было установлено, что PARP1 с высокой аффинностью взаимодействует с концами нуклеосомной ДНК, которые распознает как двуцепочечные разрывы [18]. Поэтому наиболее вероятные типы образующихся комплексов PARP1 с $1LN$ и $2LN$ могут формироваться именно с участием концов ДНК, как показано на рисунке (А, Б). Не исключено, что обнаруженные нами ранее структурные изменения в $1LN$ [9] могли быть вызваны связыванием PARP1 с коротким концом ДНК в непосредственной близости от коровой области нуклеосомы (рисунок, А). Однако новые данные, представленные на рисунке (Г), свидетельствуют, что и в случае $2LN$, где оба конца ДНК отстоят от коровой области на 20 п.н., PARP1 значительно изменяет укладку ДНК на октамере гистонов.

PARP1 является представителем группы белков, способных связываться со шпилькообразными структурами ДНК [19]. В согласии с этими данными результаты наших экспериментов показывают, что введение шпилек по концам ДНК на расстоянии 20 п.н. от коровой области не ослабляет взаимодействия нуклеосом с PARP1. Шпильки, наиболее вероятно, выступают в $2LN_h$ сайтами связывания PARP1 (рисунок, В), а образование комплекса сопровождается структурными изменениями в коровой области нуклеосом.

Для всех исследованных типов нуклеосом ($1LN$, $2LN$ и $2LN_h$) характер PARP1-индуцированных структурных изменений схож: значительное увеличение расстояния между соседними витками ДНК в коровой области, не связанное с поли(АДФ-рибоз)илированием. Можно предположить, что PARP1-опосредованные изменения в структуре нуклеосом способствуют деконденсации хроматина и облегчают доступ ферментам репарации к повреждениям ДНК.

Отметим, что в работе [20] было показано, что тринуклеосомы с закрытыми концами ДНК взаимодействуют с PARP1 не менее эффективно, чем нуклеосомы с экспонированными конца-

ми ДНК. Этот факт указывает на возможное существование дополнительного сайта связывания PARP1 с нуклеосомами, отличного от концов нуклеосомной ДНК, взаимодействие с которым может давать вклад в наблюдаемые нами структурные перестройки. Проверка этой гипотезы требует проведения дополнительных исследований, но в любом случае PARP1-индуцированные структурные изменения в нуклеосомах могут иметь прямое отношение к сигнальной и регуляторной функциям фермента. В пользу этого вывода свидетельствуют дан-

ные работы [10], в которой продемонстрирована ключевая роль PARP1 в регуляции транскрипции Sox2-зависимых генов, контролирующих состояние плюропотентности клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-54-33045). Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ludwig A., Behnke B., Holtlund J., Hilz H. Immunoquantitation and size determination of intrinsic poly(ADP-ribose) polymerase from acid precipitates. An analysis of the in vivo status in mammalian species and in lower eukaryotes // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. N 15. P. 6993–6999.
2. Ame J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. The PARP superfamily // *BioEssays*. 2004. Vol. 26. N 8. P. 882–893.
3. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1 // *Science*. 2012. Vol. 336. N 6082. P. 728–732.
4. Langelier M.F., Eisemann T., Riccio A.A., Pascal J.M. PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2018. Vol. 53. P. 187–198.
5. Pion E., Ullmann G.M., Amé J.C., Gérard D., de Murcia G., Bombarda E. DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation // *Biochemistry*. 2005. Vol. 44. N 44. P. 14670–14681.
6. Pascal J.M. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage // *DNA Repair (Amst.)*. 2018. Vol. 71. P. 177–182.
7. Haince J.F., McDonald D., Rodrigue A., Dery U., Masson J.Y., Hendzel M.J., Poirier G.G. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. N 2. P. 1197–1208.
8. Liu C., Vyas A., Kassab M.A., Singh A.K., Yu X. The role of poly ADP-ribosylation in the first wave of DNA damage response // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45. N 14. P. 8129–8141.
9. Sultanov D.C., Gerasimova N.S., Kudryashova K.S., Maluchenko N.V., Kotova E.Y., Langelier M.F., Pascal J.M., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Unfolding of core nucleosomes by PARP-1 revealed by spFRET microscopy // *AIMS Genet.* 2017. Vol. 4. N 1. P. 21–31.
10. Liu Z., Kraus K.W. Catalytic-independent functions of PARP-1 determine Sox2 pioneer activity at intractable genomic loci // *Mol. Cell*. 2017. Vol. 65. N 4. P. 589–603.
11. Valieva M.E., Armeev G.A., Kudryashova K.S., Gerasimova N.S., Shaytan A.K., Kulaeva O.I., McCullough L.L., Formosa T., Georgiev P.G., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23. N 12. P. 1111–1116.
12. Valieva M.E., Gerasimova N.S., Kudryashova K.S., Kozlova, A.L., Kirpichnikov M.P., Hu Q., Botuyan M.V., Mer G., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Stabilization of nucleosomes by histone tails and by FACT revealed by spFRET microscopy // *Cancers*. 2017. Vol. 9. N 1: 3.
13. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Chromatin Protocols*, vol. 523. *Methods Mol. Biol.* / Eds. S. Chellappan. N.Y.: Humana Press, 2009. P. 109–123.
14. Langelier M.F., Steffen J., Riccio A.A., McCauley M., Pascal J.M. Purification of DNA damage-dependent PARPs from *E. coli* for structural and biochemical analysis // *Poly(ADP-ribose) polymerase*, vol. 1608. *Methods Mol. Biol.* / Eds. A. Tulin. N.Y.: Humana Press, 2017. P. 431–444.
15. Kudryashova K.S., Nikitin D.V., Chertkov O.V., Gerasimova N.S., Valeva M.E., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Development of fluorescently labeled mononucleosomes for the investigation of transcription mechanisms by single complex microscopy // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 189–193.
16. Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Efremenko A.V.,

Solonin A.S., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Chromatin Protocols*, vol 1288. Methods Mol. Biol. / Eds. S. Chellappan. N.Y.: Humana Press, 2015. P. 395–412.

17. Polach K.J., Widom J. Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation // *J. Mol. Biol.* 1995. Vol. 254. N 2. P. 130–149.

18. Clark N.J., Kramer M., Muthurajan U.M., Luger K. Alternative modes of binding of poly(ADP-ribose) polymerase 1 to free DNA and

nucleosomes // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. N 39. P. 32430–32439.

19. Potaman V.N., Shlyakhtenko L.S., Oussatcheva E.A., Lyubchenko Y.L., Soldatenkov V.A. Specific binding of poly(ADP-ribose) polymerase-1 to cruciform hairpins // *J. Mol. Biol.* 2005. Vol. 348. N 3. P. 609–661.

20. Muthurajan U.M., Hepler M.R., Hieb A.R., Clark N.J., Kramer M., Yao T., Luger K. Automodification switches PARP-1 function from chromatin architectural protein to histone chaperone // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014. Vol. 111. N 35. P. 12752–12757.

Поступила в редакцию 07.05.2019 г.

После доработки 22.06.2019 г.

Принята в печать 02.07.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

PARP1 BINDING TO DNA BREAKS AND HAIRPINS ALTERS NUCLEOSOME STRUCTURE

N.V. Malyuchenko^{1,*}, E.Yu. Kotova², M.P. Kirpichnikov^{1,3}, V.M. Studitsky^{1,2}, A.V. Feofanov^{1,3}

¹Bioengineering Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA;

³Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, 117997, Moscow, Russia

*e-mail: mal_nat@mail.ru

Poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP1) is involved in the processes of DNA repair, replication, transcription, cell cycle regulation and apoptosis. Participation of PARP 1 in DNA repair is determined by the ability of the enzyme to interact with various defects and non-canonical structures of DNA with consequent polyADP-ribosylation of neighboring proteins. Earlier for mononucleosomes containing a DNA end recapitulating double-strand DNA break near the nucleosome, we found that PARP1 induces nucleosome structural changes in the absence of NAD⁺. In the present work we report that PARP1 induces similar structural changes in nucleosomes containing either DNA ends extending from the core by 20 b.p. or containing hairpins at the DNA ends. In all the cases PARP1 caused changes in DNA wrapping on the surface of the histone octamer that are accompanied by an increase in the distance between adjacent DNA gyres. These PARP1-mediated changes in the nucleosome structure presumably contribute to chromatin decondensation and facilitate access of repair enzymes to damaged DNA.

Keywords: *poly(ADP-ribose)polymerase 1, nucleosome, fluorescence, energy transfer, microscopy, DNA hairpins*

Сведения об авторах

Малюченко Наталия Валериевна — канд. биол. наук, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-05; e-mail: mal_nat@mail.ru

Котова Елена Юрьевна — научный сотрудник отдела эпигенетики рака ракового центра Фокс Чейз, Филадельфия, США. Тел.: +1-215-7405; e-mail: elena.kotova@fccc.edu

Кирпичников Михаил Петрович — акад. РАН, проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой биоинженерии и декан биологического факультета МГУ, зав. отделом биоинженерии ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ и отдела эпигенетики рака ракового центра Фокс Чейз, Филадельфия, США Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел. +7-495-939-57-38; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.017.6+57.033+576.53+57.022

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ «МЯГКОГО РАЗОБЩЕНИЯ»
2,4-ДИНИТРОФЕНОЛОМ НА РОСТ И ПОСЛЕДУЮЩУЮ ГИБЕЛЬ В
СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА****Г.В. Моргунова*, А.Ф. Кармушаков, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов**

*Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234,
г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru

Частичное разобщение процессов окислительного фосфорилирования и запасаения энергии в виде АТФ («мягкое разобщение») способствует снижению производства активных форм кислорода, а также может имитировать эффект ограничения питания. Целый ряд исследований позволил установить, что разобщители, подобные 2,4-динитрофенолу (ДНФ), оказывают влияние на продолжительность жизни дрозофилы, дрожжей, мышей и крыс, а также воздействуют на проявление «возрастных» изменений в репликативно стареющих культурах клеток млекопитающих и человека. Настоящее исследование посвящено изучению влияния ДНФ на рост и последующую гибель «стационарно стареющих» клеток китайского хомячка. С помощью метода определения эффективности образования колоний клетками подобрана максимально допустимая концентрация — $5 \cdot 10^{-5}$ М, в которой вещество потенциально способствует проявлению эффекта «мягкого разобщения» и не угнетает пролиферацию. В более высоких концентрациях ДНФ обладает цитотоксическим эффектом. Под влиянием ДНФ в потенциально «мягко разобщающей» концентрации ($5,6 \cdot 10^{-7}$ М) кинетика роста и гибели культуры клеток не изменяется, не увеличивается её продолжительность жизни. Подобный эффект может быть обусловлен типом исследованных клеток. Кроме того, есть вероятность, что оптимальная концентрация лежит в диапазоне от $5 \cdot 10^{-7}$ до $5 \cdot 10^{-5}$ М либо в диапазоне более низких, чем $5 \cdot 10^{-7}$ М, значений.

Ключевые слова: клеточное старение, «стационарное старение» клеток, 2,4-динитрофенол, эффективность колониеобразования, кривые выживания, геронотекторы

Окислительное фосфорилирование — биохимический механизм, обеспечивающий сопряжение окислительных реакций с процессом запасаения энергии для жизнедеятельности клетки. При разобщении сопряженных процессов высвобождаемая в ходе окисления энергия рассеивается в виде тепла. Мембранный потенциал митохондрий, создаваемый протонным насосом, определяет образование активных форм кислорода (АФК) — чем больше потенциал, тем больше вырабатывается АФК [1, 2]. Снизить образование АФК можно путем частичного разобщения дыхания и окислительного фосфорилирования при сохранении производства АТФ, достаточного для поддержания нормальной жизнеспособности [3–5]. Этот механизм называется «мягким разобщением» («mild

uncoupling»), он достигается путем повышения проводимости митохондриальной мембраны для протонов H^+ , в результате чего увеличивается потребление O_2 . Такое увеличение замедляет процесс образования АФК за счет понижения концентрации O_2 . Снижение производства АФК подобным способом считается потенциальным механизмом задержки клеточного старения [6, 7]. Кроме того, «мягкое разобщение» уменьшает как мембранный потенциал, так и трансмембранный градиент протонов (именно последний в значительной степени определяет производство АФК [8]), в результате чего происходит частичное подавление производства митохондриального супероксида за счёт снижения эффективного синтеза АТФ [9].

Существует мнение, что «мягкие разобщители» могут быть потенциальными миметиками ограничения питания [1, 10, 11], так как они ограничивают преобразование энергии в работу, и часть энергии, полученная с пищей, рассеивается. Протонофор 2,4-динитрофенол (ДНФ) — широко распространенное в 1930-х гг. средство для борьбы с ожирением, в настоящее время все чаще используется в качестве предполагаемого миметика ограничения питания. ДНФ уменьшает уровень окислительных повреждений и увеличивает среднюю продолжительность жизни у мух [12, 13]. Похожий результат был получен и на мышах: ДНФ в низких дозах способствует улучшению целого ряда физиологических показателей у животных — в том числе, снижает уровень производства АФК и уровень 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в мозге, печени и сердце, уменьшает массу тела, увеличивает среднюю продолжительность жизни [11]. У крыс ДНФ также вызывает усиление митохондриального дыхания, уменьшение скорости формирования АФК и увеличение средней продолжительности жизни [14]. Кроме того, у мышей с болезнью Хантингтона ДНФ в низких дозах вызывает снижение уровня окислительного стресса, улучшает моторные функции, однако достоверно не увеличивает среднюю продолжительность жизни [15].

В последнее время эффекты ДНФ всё чаще изучают в рамках моделей клеточного старения. В модели репликативного старения клеток с помощью ДНФ удалось увеличить количество удвоений популяции фибробластов человека и снизить активность ассоциированной со старением β -галактозидазы [16]. При изучении старения у дрожжей было обнаружено, что ДНФ увеличивает как хронологическую, так и репликативную продолжительность жизни, снижает образование H_2O_2 и повышает выживаемость клеток [10]. ДНФ в низких концентрациях способствует дифференцировке нейронов линии нервных клеток и разрастанию нейритов в первичных культивируемых нейронах [17, 18], он улучшает дифференцировку, пролиферацию и миграцию эмбриональных стволовых клеток мыши, а также защищает их от гибели [19].

Несмотря на множество доказательств положительного влияния ДНФ на самые разные модельные объекты в экспериментах, необходимо помнить, что есть лишь небольшой диапазон концентраций, в которых он вызывает проявление положительных эффектов [1]. В связи с этим сложно найти ту концентрацию ДНФ, которая будет соответствовать «мягкому разобщению», поэтому необходимо тщательно подбирать дозу для постановки экспериментов.

Интересно было бы изучить, как повлияет ДНФ на продолжительность жизни «стационарно стареющей» культуры клеток млекопитающих. При хронологическом старении дрожжей и «стационарном старении» культивируемых клеток млекопитающих происходит ограничение пролиферации вследствие контактного торможения, в результате чего клетки не обновляются и в них происходят разного рода изменения, сходные с изменениями, характерными для стареющих многоклеточных организмов [20–24]. В настоящем исследовании мы попытались изучить действие ДНФ на жизнеспособность, рост и гибель непересеваемой культуры трансформированных клеток китайского хомячка.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на трансформированных клетках китайского хомячка перевиваемой линии B11-dii-FAF28 (клон 237), полученной из ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (Москва). Клетки культивировали при 37°C в стеклянных флаконах Карреля, используя среду Игла в модификации Дульбекко (HyClone, США) с добавлением 5–10% сыворотки крови крупного рогатого скота («РАА», Австрия), пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Поддерживая культуру, клетки пересевали в соотношении 1:10–1:3 через каждые 3–4 сут. Снимали клетки с поверхности роста с помощью смеси (1:1) 0,02%-го версена и 0,25%-го трипсина (ФГБУ «НИИ вирусологии имени Д.И. Ивановского» Минздрава России, Москва). Перед приготовлением раствора ДНФ произвели его перекристаллизацию и спектрофотометрически подтвердили чистоту полученного вещества. Для этого 2 г водной суспензии ДНФ (0,5 мл воды/г; Merck-Schuchardt GmbH, Германия) поместили в колбу объемом 200 мл. Добавили 100 мл воды, затем довели до кипения с обратным охлаждением. Профильтровали раствор через бумажный фильтр, фильтрат поставили в холодильник для кристаллизации. Полученный осадок профильтровали через стеклянный фильтр, а затем поместили в бюкс и оставили на 2 сут в вакууме в присутствии безводного гидроксида калия. Приготовили раствор ДНФ ($2,486 \cdot 10^{-2}$ М) в буфере Tris-HCl (pH 8,05). Поглощение раствора измеряли с помощью спектрофотометра «Helios α » (Unicam, США). Перед измерением поглощения провели калибровку спектрофотометра с использованием стандартных фильтров.

В предварительных исследованиях, направленных на определение цитотоксических и митогенных свойств ДНФ, клетки в «возрасте»

3–4 сут (т.е. культивируемые без пересева в течение 3–4 сут) засеивали в герметично закрывающиеся пенициллиновые флаконы с плотностью около 40 тыс. клеток/см². Через сутки добавляли во флаконы среду, содержащую ДНФ, конечные концентрации — от $3,73 \cdot 10^{-10}$ М до $3,73 \cdot 10^{-4}$ М. В контрольные флаконы добавляли среду с соответствующим количеством дистиллированной воды качества Milli-Q. Флаконы помещали на 4 сут в термостат (37°C), после чего клетки снимали с поверхности роста смесью растворов версена и трипсина, а затем оценивали их количество с помощью гемоцитометра (камеры Горяева).

В связи с необходимостью поиска концентрации ДНФ, которую можно будет назвать «мягко разбавляющей», определяли его цитотоксическое влияние с использованием метода оценки эффективности образования колоний (ЭОК) и определением разработанного в нашей лаборатории показателя средневзвешенного номера класса (СВНК) распределения клеточных колоний по размеру [25, 26]. Для этого в чашки Петри («Nunc», Дания) площадью 10 см² добавляли 2,5 мл суспензии клеток (100 или 200 клеток) в ростовой среде, содержащей 90% среды Игла в модификации Дульбекко и 10% эмбриональной телячьей сыворотки FetalClone III (HyClone; GE Healthcare Life Sciences, США). Помещали чашки в СО₂-инкубатор EG 115 IR (Joan, США), условия культивирования — 37°C, 10% СО₂; через сутки в часть из них добавляли водные растворы ДНФ (конечные концентрации в культуральной среде составили $5 \cdot 10^{-6}$ М, $5 \cdot 10^{-5}$ М, $7,5 \cdot 10^{-5}$ М, $1 \cdot 10^{-4}$ М, $2 \cdot 10^{-4}$ М, $6,4 \cdot 10^{-4}$ М), в чашки из контрольной группы — дистиллированную воду. По окончании инкубации (через 4 сут) клетки промывали средой без сыворотки, фиксировали в течение 8 мин 75%-ным раствором этанола, промывали дистиллированной водой, окрашивали в течение 3 мин 0,1%-ным водным раствором метиленового синего и снова промывали дистиллированной водой. Затем производили подсчёт как количества образовавшихся колоний, так и количества клеток в этих колониях. Для определения ЭОК мы считали колониями образования, включавшие в себя 16 и более клеток, для СВНК — 2 и более клетки (для того, чтобы повысить чувствительность метода). При оценке СВНК мы разбивали все колонии на 17 классов в зависимости от их величины: 1-й класс — 2–15 клеток, 2-й класс — 16–31 клетка, 3-й класс — 32–47 клеток, ..., 16-й класс — 240–255 клеток, 17-й класс — 256 и более клеток. Сдвиг распределения в сторону колоний большего размера приводит к возрастанию СВНК и сви-

детельствует об улучшении функционального состояния изучаемой культуры, сдвиг в сторону колоний меньшего размера говорит о снижении пролиферативной активности клеток. Для расчёта ЭОК использовали формулу:

$$\text{ЭОК} = \frac{K}{N} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где N — количество посеянных клеток, K — количество выросших колоний. Расчёт СВНК производили по формуле:

$$\text{СВНК} = \sum_{i=1}^n \left(\frac{C_i}{M} \cdot i \right), \quad (2)$$

где i — номер класса, n — количество классов, C_i — количество колоний в классе « i », M — общее количество колоний.

Для оценки влияния ДНФ на кинетику роста клеток и их последующую гибель в стационарной фазе 3-суточные клетки засеивали в пенициллиновые флаконы с плотностью 45 тыс. клеток/см². На следующие сутки подсчитывали количество прикрепившихся клеток и добавляли во флаконы среду, содержащую ДНФ (конечная концентрация — $5,6 \cdot 10^{-4}$ М как «сильно разбавляющая» и $5,6 \cdot 10^{-7}$ М — как потенциально «мягко разбавляющая»), во флаконы контрольной группы — среду с соответствующим объёмом воды. Через определенные промежутки времени снимали клетки с поверхности роста смесью растворов версена и трипсина, затем оценивали их количество с помощью камер Горяева (3 флакона на точку, 4 камеры на флакон).

При сравнении данных по цитотоксичности использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Полученные кривые гибели клеток аппроксимировали с помощью уравнения Гомпертца [27]. Математические расчёты и статистическую обработку данных производили с помощью программы SigmaPlot 12.0. Все результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего.

Результаты и обсуждение

В первую очередь проверили чистоту используемого ДНФ. Для этого произвели перекристаллизацию вещества и оценили спектрофотометрически его качество. Форма спектра (рис. 1) и коэффициент молярной экстинкции при 360 нм ($14656 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) совпали с литературными данными [28], что позволяет судить о достаточной чистоте препарата.

В предварительном эксперименте оценили влияние ДНФ в широком диапазоне concentra-

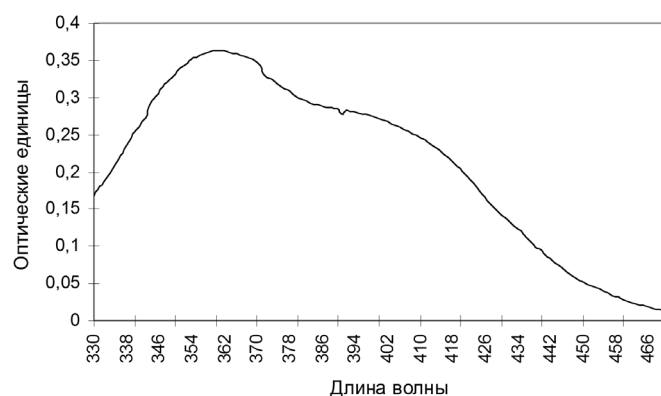


Рис. 1. Спектр поглощения УФ-излучения раствором перекристаллизованного 2,4-динитрофенола

ций — от $3,73 \cdot 10^{-10}$ М до $3,73 \cdot 10^{-4}$ М — на рост и жизнеспособность клеток. Установили, что через 4 сут после посева достоверно плотность культуры клеток снижается только в группе, подвергнутой влиянию ДНФ в самой высокой из использованных концентраций — $3,73 \cdot 10^{-4}$ М (рис. 2). Подобный цитотоксический эффект позволяет предполагать, что данная концентрация может считаться «сильно разобщающей».

Так как подобрать концентрацию ДНФ, в которой препарат будет вызывать эффект «мягкого разобщения», довольно сложная задача, провели более детальный анализ с использованием метода определения ЭОК. Помимо подсчёта колоний определяли количество клеток в каждой колонии, а также строили распределение колоний по размерам с последующей оценкой СВНК. Определение показателя СВНК позволяет выявить более тонкие изменения ЭОК, чем простой подсчёт количества колоний. Исследовали влияние ДНФ в концентрациях от

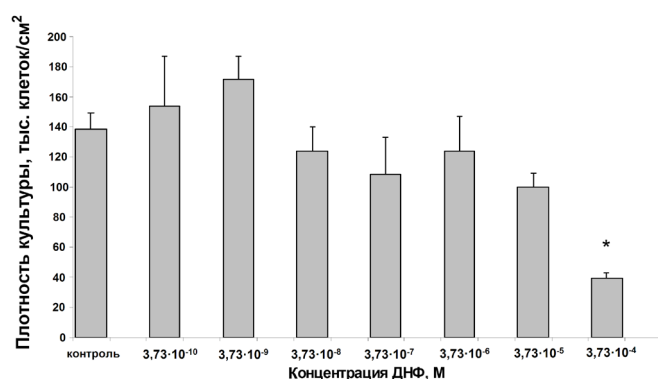


Рис. 2. Влияние 2,4-динитрофенола в различных концентрациях на плотность культуры клеток китайского хомячка на 4-е сут роста (плотность посева 40 тыс. клеток/см²). Приведены средние $\pm$ стандартные ошибки средних. * — достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

$5 \cdot 10^{-5}$ до $6,4 \cdot 10^{-4}$. ДНФ в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М почти полностью (рис. 3), а в концентрации $6,4 \cdot 10^{-4}$ М — полностью подавляет пролиферацию клеток. Только в самой малой концентрации, $5 \cdot 10^{-5}$ М, соединение не снижает ЭОК и не влияет на СВНК (таблица). Результаты согласуются с данными других авторов [29], в работах которых было показано, что ДНФ в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М на 20% снижает уровень АТФ в нормальных фибробластах человека и в то же время увеличивает их чувствительность к действию H_2O_2 .

В дополнительных экспериментах оценили ЭОК и СВНК при добавлении ДНФ в среду до конечной концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ и $5 \cdot 10^{-6}$ М. ЭОК в обеих группах ($20,68 \pm 1,8$ и $23,12 \pm 2,3$ соответственно) достоверно не отличается от контрольного показателя ($20,6 \pm 1,6$). СВНК выше в группе $5 \cdot 10^{-6}$ М ($4,01 \pm 0,17$), чем в группе $5 \cdot 10^{-5}$ М ($2,75 \pm 0,25$), но оба показателя не отличаются достоверно от значения в контроле

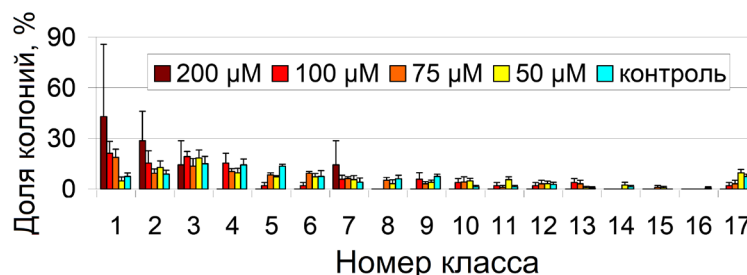


Рис. 3. Влияние 2,4-динитрофенола в различных концентрациях на колониеобразующую способность культуры трансформированных клеток китайского хомячка (пояснения в тексте). Приведены средние $\pm$ стандартные ошибки средних

($3,42 \pm 0,33$). Можно предположить, что «мягко разобщающая» концентрация для клеток китайского хомячка должна быть близка к значению $5 \cdot 10^{-6}$ М. Однако известно, что ДНФ в концентрациях $1 \cdot 10^{-5}$ и $5 \cdot 10^{-5}$ М, а другие разобщители и в более низких концентрациях (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone, CCCP — $5 \cdot 10^{-6}$ и $1 \cdot 10^{-5}$ М; carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, FCCP — $1,5 \cdot 10^{-6}$ и $3 \cdot 10^{-6}$ М) ухудшают пролиферацию как клеток млекопитающих, так и дрожжей [30, 31]. Также установлено, что ДНФ в сниженных по сравнению с рекомендованными другими авторами концентрациях уменьшает протонный градиент митохондрий [32], в связи с чем даже для модельных организмов, таких как рыбка данио (*Danio rerio*), в качестве разобщающей предлагается использовать концентрацию $5 \cdot 10^{-7}$ М. В работах, в которых удалось увеличить продолжительность жизни дрожжей, использовались довольно низкие концентрации — 10^{-8} и даже 10^{-9} М [10]. Для построения кривой роста и гибели

Таблица
Влияние ДНФ в разных концентрациях на показатель эффективности образования колоний (ЭОК) клетками китайского хомячка, а также на средневзвешенный номер класса (СВНК) распределения колоний по размеру для каждой из групп. Приведены средние ± ошибки среднего

Концентрация ДНФ, М	ЭОК, %	СВНК
$2 \cdot 10^{-4}$	$0,8 \pm 0,4$ (*)	$2,2 \pm 1,3$ (*)
$1 \cdot 10^{-4}$	$8,2 \pm 1,2$ (*)	$4,4 \pm 0,6$ (*)
$7,5 \cdot 10^{-5}$	$15,6 \pm 1,8$ (*)	$5,2 \pm 0,5$
$5 \cdot 10^{-5}$	$23,8 \pm 1,3$	$6,9 \pm 0,6$
контроль	$27,2 \pm 3,7$	$6,3 \pm 0,4$

Примечание: * – обозначено достоверное отличие от показателя в контрольной группе, $p < 0,05$

культуры клеток под влиянием ДНФ мы выбрали две концентрации – $5,6 \cdot 10^{-4}$ М (как «сильно разобшающую») и $5,6 \cdot 10^{-7}$ М (как потенциально «мягко разобшающую», гарантированно не вызывающую цитотоксического эффекта).

Как и ожидалось, клетки из группы, в среду которой добавляли ДНФ в концентрации $5,6 \cdot 10^{-4}$ М, погибали через 3 сут. Что же касается концентрации $5,6 \cdot 10^{-7}$ М, которая должна была вызывать «мягкое разобшение», то ДНФ в этом случае никак не повлиял на кинетику роста и последующее вымирание культуры (рис. 4). Мы аппроксимировали данные о гибели культуры с помощью уравнения Гомпертца (R^2 для контрольной группы – 0,951, R^2 для опытной группы – 0,826), чтобы получить параметры, характеризующие вымирание, – такие как модальная продолжительность жизни (момент времени, когда скорость вымирания популяции максимальна – соответствует точке перегиба на кривой Гомпертца), а также сила смертности в нулевой

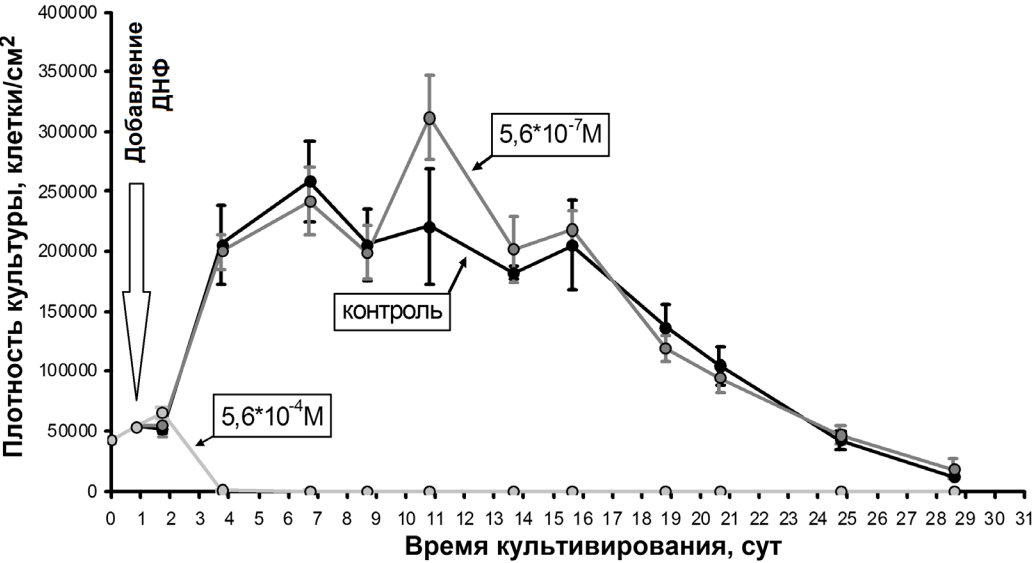


Рис. 4. Влияние 2,4-динитрофенола в концентрациях $5,6 \cdot 10^{-4}$ М («сильно разобшающая») и $5,6 \cdot 10^{-7}$ М (потенциально «мягко разобшающая») на кинетику роста и последующую гибель культуры трансформированных клеток китайского хомячка. После добавления ДНФ в разобшающей концентрации клетки перестают пролиферировать и вымирают через 3 сут. При добавлении ДНФ в потенциально «мягко разобшающей» концентрации клетки растут и погибают так же, как и в контрольной группе (модальная продолжительность жизни в контрольной группе – $18,495 \pm 0,824$ сут, в группе $5,6 \cdot 10^{-7}$ М – $17,793 \pm 1,452$ сут; плотность культуры к моменту начала вымирания в контроле – 230655 ± 16377 клеток/см², в группе $5,6 \cdot 10^{-7}$ М – 243255 ± 30548 клеток/см²). Приведены средние ± стандартные ошибки средних

момент времени и темп старения культуры. Ни по одному из параметров не обнаружили достоверных различий между группами. Отсутствие какого-либо эффекта может быть обусловлено тем, что «мягкое разобшение» не влияет либо на старение в целом, либо на «стационарное старение» культур клеток. Также нельзя исключить, что оно не даёт никаких преимуществ конкретной изучаемой культуре клеток. Возможно, эффект «мягкого разобшения» является тканеспецифичным, т.е. с его помощью может увеличиваться продолжительность жизни только определённых типов тканей [33, 34]. Так, например, было показано, что мышцы, состоящие преимущественно из быстрых волокон, обладают лучшей выживаемостью, несмотря на их высокую функциональную активность, по сравнению с мышцами, в состав которых входят медленные волокна. При этом для быстрых волокон характерны увеличенное потребление O_2 , более низкий уровень АФК и сниженный уровень повреждений митохондрий [35]. Также по-разному влияет «мягкое разобшение», вызван-

ное добавлением ДНФ, на метаболизм различных линий клеток [30]. Кроме того, нельзя исключить, что выбранная доза разобшителя не является оптимальной. Мы установили, что «мягко разобшающие» концентрации

необходимо искать в диапазоне от сверхнизких значений до $5 \cdot 10^{-5}$ М, так как ДНФ в более высокой концентрации способствует угнетению пролиферации. Необходимо проверить, как изменятся поглощение O_2 клетками и уровень АТФ при воздействии соединения в разных концентрациях, не превышающих найденное пограничное значение, при этом подходящая концентрация может быть как выше $5,6 \cdot 10^{-7}$ М, так и между $5 \cdot 10^{-5}$ М и $5,6 \cdot 10^{-7}$ М.

Авторы выражают признательность Д.С. Есипову за помощь с определением чистоты ДНФ. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-00813 мол_а).

Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mookerjee S.A., Divakaruni A.S., Jastroch M., Brand M.D. Mitochondrial uncoupling and lifespan // *Mech. Ageing Dev.* 2010. Vol. 131. N 7–8. P. 463–472.
2. Zorova L.D., Popkov V.A., Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Pevzner I.B., Jankauskas S.S., Babenko V.A., Zorov S.D., Balakireva A.V., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial membrane potential // *Anal. Biochem.* 2018. Vol. 552. P. 50–59.
3. Skulachev V.P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants // *Q. Rev. Biophys.* 1996. Vol. 29. N 2. P. 169–202.
4. Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 416. N 1. P. 15–18.
5. Starkov A.A. “Mild” uncoupling of mitochondria // *Bioscience Rep.* 1997. Vol. 17. N 3. P. 273–279.
6. Papa S., Skulachev V.P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging // *Detection of mitochondrial diseases*, vol. 21 / Eds. F.N. Gellerich and S. Zierz. Boston: Springer, 1997. P. 305–319.
7. Brand M.D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing // *Exp. Gerontol.* 2000. Vol. 35. N 6–7. P. 811–820.
8. Lambert A.J., Brand M.D. Superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane // *Biochem. J.* 2004. Vol. 382. N 2. P. 511–517.
9. Brand M.D., Affourtit C., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Pakay J.L., Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. Vol. 37. N 6. P. 755–767.
10. Barros M.H., Bandy B., Tahara E.B., Kowaltowski A.J. Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. N 48. P. 49883–49888.
11. Caldeira da Silva C.C., Cerqueira F.M., Barbosa L.F., Medeiros M.H., Kowaltowski A.J. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity // *Aging Cell.* 2008. Vol. 7. N 4. P. 552–560.
12. Miquel J., Fleming J., Economos A.C. Antioxidants, metabolic rate and aging in *Drosophila* // *Arch. Gerontol. Geriatr.* 1982. Vol. 1. N 2. P. 159–165.
13. Padalko V.I. Uncoupler of oxidative phosphorylation prolongs the lifespan of *Drosophila* // *Biochemistry (Mosc.)*. 2005. Vol. 70. N 9. P. 986–989.
14. Падалко В.И., Леонова И.С., Козлова Е.В. Влияние 2,4-динитрофенола на интенсивность окислительных процессов в печени крыс в длительном эксперименте // *Усп. геронтол.* 2010. Т. 23. № 1. С. 98–103.
15. Wu B., Jiang M., Peng Q., Li G., Hou Z., Milne G.L., Mori S., Alonso R., Geisler J.G., Duan W. 2,4 DNP improves motor function, preserves medium spiny neuronal identity, and reduces oxidative stress in a mouse model of Huntington's disease // *Exp. Neurol.* 2017. Vol. 293. P. 83–90.
16. Passos J.F., Saretzki G., Ahmed S., Nelson G., Richter T., Peters H., Wappler I., Birket M.J., Harold G., Schaeuble K., Birch-Machin M.A., Kirkwood T.B.L., von Zglinicki T. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence // *PLoS Biol.* 2007. Vol. 5. N 5. P. 1138–1151.
17. Wasilewska-Sampaio A.P., Silveira M.S., Holub O., Goecking R., Gomes F.C., Neto V.M., Linden R., Ferreira S.T., De Felice F.G. Neuritogenesis and neuronal differentiation promoted by 2,4-dinitrophenol, a novel anti-amyloidogenic compound // *FASEB J.* 2005. Vol. 19. N 12. P. 1627–1636.
18. Sebollela A., Freitas-Corrêa L., Oliveira F.F., Mendes C.T., Wasilewska-Sampaio A.P., Camacho-

- Pereira J., Galina A., Brentani H., Passetti F., De Felice F.G., Dias-Neto E. Expression profile of rat hippocampal neurons treated with the neuroprotective compound 2,4-dinitrophenol: up-regulation of cAMP signaling genes // *Neurotox. Res.* 2010. Vol. 18. N 2. P. 112–123.
19. Freitas-Correa L., Lourenco M.V., Acquarone M., da Costa R.F.M., Galina A., Rehen S.K., Ferreira S.T. 2,4-dinitrophenol induces neural differentiation of murine embryonic stem cells // *Stem Cell Res.* 2013. Vol. 11. N 3. P. 1407–1416.
20. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Interpretation of data about the impact of biologically active compounds on viability of cultured cells of various origin from a gerontological point of view // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 2. P. 67–70.
21. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons // *Anti-aging drugs: From basic research to clinical practice* / Ed. A.M. Vaiserman. Royal Society of Chemistry, 2017. P. 53–74.
22. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Marotta F., Khokhlov A.N. Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 2. P. 47–51.
23. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. On choosing control objects in experimental gerontological research // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 2. P. 59–62.
24. Morgunova G.V., Klebanov A.A. Impairment of the viability of transformed Chinese hamster cells in a nonsubcultured culture under the influence of exogenous oxidized guanoside is manifested only in the stationary phase of growth // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 3. P. 124–129.
25. Alinkina E.S., Vorobyova A.K., Misharina T.A., Fatkullina L.D., Burlakova E.B., Khokhlov A.N. Cyto gerontological studies of biological activity of oregano essential oil // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2012. Vol. 67. N 2. P. 52–57.
26. Yablonskaya O.I., Ryndina T.S., Voeikov V.L., Khokhlov A.N. A paradoxical effect of hydrated C₆₀-fullerene at an ultralow concentration on the viability and aging of cultured Chinese hamster cells // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2013. Vol. 68. N 2. P. 63–68.
27. Khokhlov A.N. Cell kinetic approaches to the search for anti-aging drugs: Thirty years after // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 4. P. 185–190.
28. Chappelet-Tordo D., Fosset M., Iwatsubo M., Gaché C., Lazdunski M. Intestinal alkaline phosphatase. Catalytic properties and half of the sites reactivity // *Biochemistry.* 1974. Vol. 13. N 9. P. 1788–1795.
29. Miyoshi N., Oubrahim H., Chock P.B., Stadtman E.R. Age-dependent cell death and the role of ATP in hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. Vol. 103. N 6. P. 1727–1731.
30. Desquiere V., Loiseau D., Jacques C., Douay O., Malathiury Y., Ritz P., Roussel D. Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling *in vivo* triggers respiratory adaptation in HepG2 cells // *BBA-Bioenergetics.* 2006. Vol. 1757. N 1. P. 21–30.
31. Stöckl P., Zankl C., Hütter E., Unterluggauer H., Laun P., Heeren G., Bogengruber E., Herndler-Brandstetter D., Breitenbach M., Jansen-Dürr P. Partial uncoupling of oxidative phosphorylation induces premature senescence in human fibroblasts and yeast mother cells // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. Vol. 43. N 6. P. 947–958.
32. Bestman J.E., Stackley K.D., Rahn J.J., Williamson T.J., Chan S.S. The cellular and molecular progression of mitochondrial dysfunction induced by 2,4-dinitrophenol in developing zebrafish embryos // *Differentiation.* 2015. Vol. 89. N 3–4. P. 51–69.
33. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Some remarks on the relationship between autophagy, cell aging, and cell proliferation restriction // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 4. P. 207–211.
34. Morgunova G.V., Klebanov A.A. Age-related AMP-activated protein kinase alterations: From cellular energetics to longevity // *Cell Biochem. Funct.* 2019. Vol. 37. N 3. P. 169–176.
35. Amara C.E., Shankland E.G., Jubrias S.A., Marcinek D.J., Kushmerick M.J., Conley K.E. Mild mitochondrial uncoupling impacts cellular aging in human muscles *in vivo* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007. Vol. 104. N 3. P. 1057–1062.

Поступила в редакцию 30.04.2019 г.

После доработки 10.06.2019 г.

Принята в печать 08.07.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

STUDIES OF THE EFFECT OF «MILD» UNCOUPLING WITH 2,4-DINITROPHENOL ON GROWTH AND SUBSEQUENT DEATH OF CULTURE OF CHINESE HAMSTER CELLS IN THE STATIONARY PHASE**G.V. Morgunova*, A.F. Karmushakov, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov***Evolutionary Cytoogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia***e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru*

Partial uncoupling of processes of oxidative phosphorylation and energy storage in the form of ATP («mild» uncoupling) helps reduce the production of reactive oxygen species and can also mimic the effect of calorie restriction. A number of studies have shown that uncouplers like 2,4-dinitrophenol (DNP) affect the lifespan of *Drosophila*, yeast, mice and rats, as well as the manifestation of «age-related» changes in replicative senescence mammalian and human cell cultures. This paper is devoted to studying the effect of DNP on the growth and death of «stationary phase aging» Chinese hamster cells. Using the method for determining the colony-forming efficiency of cells, the maximum permissible concentration was selected, $5 \cdot 10^{-5}$ M, in which the substance potentially contributes to the manifestation of the effect of «mild» uncoupling and does not inhibit cell proliferation. At higher concentrations, DNP has a cytotoxic effect for the studied cell culture. Under the influence of DNP, the kinetics of cell growth and cell death does not change in the potentially «mild» uncoupling concentration ($5.6 \cdot 10^{-7}$ M), the lifespan of the cell culture does not increase. A similar effect may be due to the type of cells studied. In addition, there is a probability that the optimal concentration lies in the range from $5 \cdot 10^{-7}$ to $5 \cdot 10^{-5}$ M, or lower than $5 \cdot 10^{-7}$ M.

Keywords: *cell aging, «stationary phase aging», 2,4-dinitrophenol, colony-forming efficiency, survival curve, geroprotectors*

Сведения об авторах

Моргунова Галина Васильевна — науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: *morgunova@mail.bio.msu.ru*

Кармушаков Азар Фатфулович — инженер сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: *karmushakov@mail.ru*

Клебанов Александр Александрович — науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: *klebanov@mail.bio.msu.ru*

Хохлов Александр Николаевич — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: *khokhlov@mail.bio.msu.ru*

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 591.112.1

ЭФФЕКТЫ АКТИВАЦИИ α_1 -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В МЕЖПРЕДСЕРДНОЙ ПЕРЕГОРОДКЕ У НОВОРОЖДЕННЫХ И ВЗРОСЛЫХ КРЫСК.Б. Пустовит^{1,2,*}, Е.А. Малолина³

¹Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12;

²кафедра физиологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1;

³лаборатория эволюционной биологии развития, Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26
*e-mail: k_pustovit@mail.ru

Биоэлектрические свойства различных формирующихся участков сердца претерпевают существенные изменения в ходе пре- и постнатального онтогенеза. Тем не менее, именно ранние этапы эмбриогенеза определяют не только общую схему строения сердца, но и особенности биоэлектрической активности в различных участках «зрелого» сердца. В частности, гистологическими методами в межпредсердной перегородке (МПП) сердца млекопитающих показано наличие миокарда с фенотипом, сходным с пейсмекерным. Однако электрическая активность в данной структуре остается неизученной. Цель данной работы заключалась в изучении способности МПП спонтанно генерировать потенциалы действия (ПД), а также в исследовании эффектов адренергического воздействия на биоэлектрическую активность МПП сердца. Для этого регистрировали потенциал покоя и ПД с помощью стандартной микроэлектродной техники в многоклеточных перфузируемых изолированных препаратах МПП и левого предсердия, полученных из сердца крысы в конце первых суток постнатального развития, а также на 60-е сут жизни. В нашей работе α_1 -адреномиметик фенилэфрин (ФЭ) оказал воздействие на конфигурацию ПД в препаратах как МПП, так и предсердного миокарда, полученных от животных обеих возрастных групп. Также в покоящихся препаратах, т.е. без электрической стимуляции, ФЭ вызывал возникновение спонтанных ПД в МПП, но не в предсердии, что может быть связано с колебаниями уровня цитоплазматического кальция. При подаче ZD 7288 – блокатора тока, активируемого гиперполяризацией (I_f), наблюдалось снижение скорости медленной диастолической деполяризации ПД в пейсмекерных клетках МПП, снижение частоты и появление пачечной активности. Таким образом, миокард МПП новорожденных и взрослых крыс генерирует спонтанную электрическую активность. Необходимым условием возникновения пейсмекерной активности является адренергическая стимуляция. Способность к спонтанной активности, по всей видимости, связана с наличием в кардиомиоцитах МПП пейсмекерного тока I_f .

Ключевые слова: сердце, межпредсердная перегородка, пейсмекер, биоэлектрическая активность, потенциал действия, постнатальное развитие

Электрическая активность сердца является определяющей для его нормального функционирования. Нарушения механизмов генерации электрической активности в сердце, а также последовательности распространения возбуждения по миокарду приводят к тяжелым нарушениям

сердечной деятельности – аритмиям. В частности, аритмогенную роль могут играть участки миокарда, способные к спонтанной генерации электрической активности, но лежащие за пределами синоатриального и атриовентрикулярного узлов автоматии сердца. Такие эктопические

очаги автоматии могут появляться при различных сердечных патологиях, однако некоторые имеются и в здоровом сердце, возникая в ходе пре- и постнатального онтогенеза.

В ходе эмбрионального развития сердце проходит ряд последовательных стадий. Сначала образуются клетки-предшественники всех сердечных структур, они локализуются в эпибласте [1]. Во время гастрюляции эти клетки опускаются вглубь, формируя билатеральное образование, доли которого впоследствии смыкаются. Позже происходит формирование будущей сердечной трубки (трубчатого сердца). Она состоит из так называемого «первичного сердечного миокарда». Его фенотипическими признаками являются медленная скорость проведения волны возбуждения, низкая сократимость и способность к спонтанной деполяризации [1, 2]. Кроме того, в процессе эмбрионального развития клетки «первичного миокарда» трансформируются во «вторичный миокард» [3], из него состоят будущие желудочки и предсердия.

Существует целый ряд данных об эмбриональном происхождении межпредсердной перегородки (МПП). Несмотря на то, что первичный миокард в основном преобразуется во вторичный, он сохраняется в синоатриальном и атриовентрикулярном узлах [4–6]. Также в предсердиях взрослого сердца сохраняется ряд других участков первичного миокарда, в которых возможно возникновение спонтанной активности, сходной с активностью пейсмекеров сердца. Элементы первичного миокарда сохраняются, например, в районе митрального клапана и в МПП [7, 8]. Таким образом, МПП примечательна тем, что в ней присутствует как первичный миокард, так и вторичный.

На сегодняшний день практически нет исследований электрофизиологических особенностей МПП крыс. В связи с этим вопрос о том, оказывает ли первичный миокард, сохраняющийся в МПП у взрослого организма, влияние на электрофизиологические свойства данной области сердца, остается открытым. Целью данной работы являлось выяснение вопроса о влиянии селективного агониста α_1 -адренорецепторов фенилэфрина (ФЭ) на электрическую активность МПП и роли ФЭ в формировании потенциальной аритмогенной активности в данной ткани в сердце новорожденных и взрослых животных.

Материалы и методы

Работа выполнена на изолированных многоклеточных препаратах сердца крысы. Всего было получено по одному препарату от 62 животных. В ходе экспериментов были соблюдены

все актуальные требования этических норм работы с лабораторными животными, установленные комиссией по биоэтике МГУ. Половозрелые самцы и самки крыс (Wistar, 250–300 г, возраст 9 нед.) были получены из питомника «Научный центр биомедицинских технологий» (Россия, Москва) и использованы для получения потомства. Животных содержали в виварии в стандартных условиях при световом режиме 12:12 с доступом к воде и пище *ad libitum*.

В экспериментах использовали препараты сердца, полученные от крыс в конце первых суток постнатального развития ($n=32$), а также на 60-е сут постнатального развития ($n=30$). Крыс в возрасте 60 сут считали взрослыми.

Для изучения биоэлектрической активности сердца регистрировали потенциалы действия (ПД) в изолированных многоклеточных перфузируемых препаратах МПП и левого предсердия (ЛП) при помощи стандартной микроэлектродной техники согласно процедуре, подробно описанной ранее [9, 10].

Перед экспериментом крыс декапитировали, вскрывали грудную клетку, извлекали сердце, выделяли многоклеточные препараты. Препараты помещали в экспериментальную камеру и перфузировали при 37°C оксигенированным (O_2 – 95%, CO_2 – 5%) раствором Тироде (состав, mM: NaCl – 129; KCl – 4; NaH_2PO_4 – 2,9; $MgSO_4$ – 0,5; $NaHCO_3$ – 20; $CaCl_2$ – 1,2; глюкоза – 5; pH 7,2–7,4) со скоростью потока 10 мл/мин. Во всех многоклеточных препаратах, за исключением препаратов из экспериментов с регистрацией спонтанной активности, ПД вызывали нанесением электрических стимулов при помощи серебряных электродов в тефлоновой оболочке, соединенных со стимулятором ЭСЛ-2 (СССР) (частота стимуляции – 4 Гц, длительность прямоугольных импульсов – 2 мс, амплитуда импульсов – 3–10 В).

ПД отводили с эндокардиальной стороны многоклеточных препаратов. Для отведения ПД использовали стеклянные микроэлектроды (сопротивление – 20–50 МОм), подключенные к усилителю (A-M system 1600, США). Усиленный сигнал поступал на АЦП (Е-154, L-Card, Россия) и далее обрабатывался на компьютере с помощью программы «Power Graph 3.3» (Диасофт, Россия). Во всех экспериментах с помощью программы «MiniAnalysis 6.0.7» (Synaptosoft, США) оценивали уровень потенциала покоя (ПП), а также длительность ПД на уровне 50 и 90% реполяризации (ДПД50, ДПД90), скорость медленной диастолической деполяризации и частоту генерации ПД.

После получасовой адаптации многоклеточных препаратов к экспериментальным условиям

выполняли следующие три вида экспериментов: (1) регистрация вызванных ПД в МПП и ЛП в контрольных условиях, а затем на фоне действия 10 мкМ ФЭ (Sigma-Aldrich, США); (2) регистрация ПП в покое в препарате МПП в контроле и на фоне действия 10 мкМ ФЭ; (3) регистрация спонтанных ПД, индуцированных ФЭ, в препарате МПП в норме и на фоне 10 мкМ блокатора каналов тока I_f — ZD 7288 (Tocris, Великобритания).

Для статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, США). Статистически зна-

и 42 ± 4 мс и $16,6 \pm 3$ мс (ЛП) ($n=6$) соответственно.

Контрольные значения ПП в МПП новорожденных и взрослых животных составили -65 ± 3 мВ ($n=6$) и -68 ± 2 мВ ($n=6$) соответственно. Известно, что в рабочем миокарде крыс, по классическим представлениям, уровень ПП составляет в среднем -85 мВ [11], что мы и наблюдали в предсердии новорожденных (-83 ± 2 мВ, $n=6$) или взрослых крыс (-84 ± 3 мВ, $n=6$).

Основным агонистом, как α -, так и β -адренорецепторов является норадреналин.

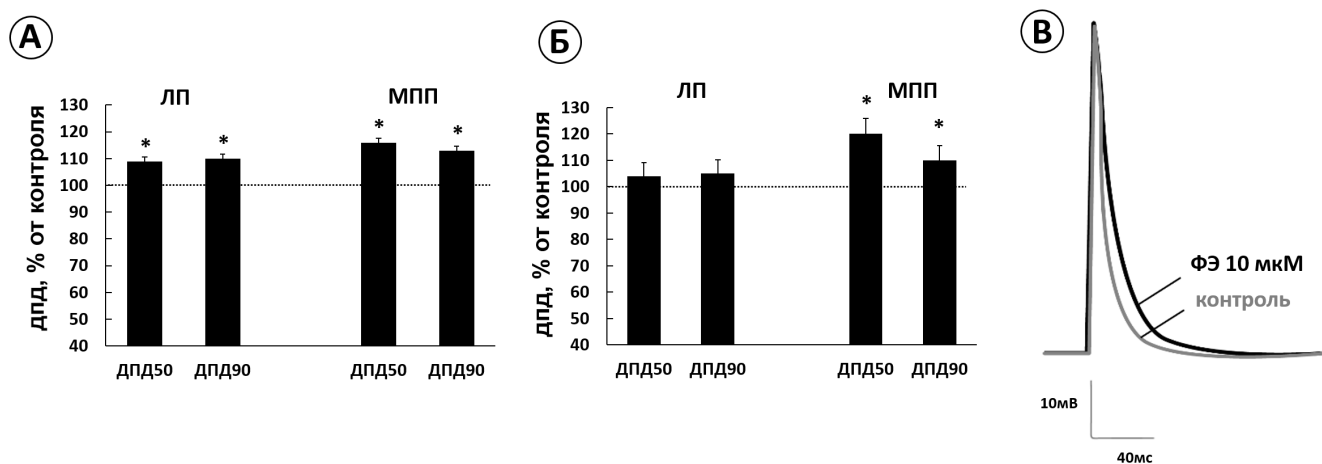


Рис. 1. Влияние α_1 -адреномиметика фенилэфрина (ФЭ, 10 мкМ) на длительность потенциалов действия на уровне реполяризации 50 и 90% (ДПД50 и ДПД90) в миокарде левого предсердия (ЛП) и межпредсердной перегородки (МПП) взрослых крыс (А) и новорожденных крыс (Б); В — репрезентативные примеры ПД в МПП новорожденных крыс в контрольных условиях и при действии ФЭ, 10 мкМ. Длительность потенциалов действия в контрольных условиях принята за 100% (пунктирная линия). * — $p < 0,05$, сравнение длительности ПД при действии ФЭ с длительностью, наблюдаемой в контрольных условиях

чимые различия между группами выявляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с последующим применением тестов для множественных сравнений в группах с повторными или независимыми измерениями post-hoc и внесением поправки Даннета после предварительной проверки нормальности распределения в группах с помощью теста Шапиро-Вилка. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

В наших экспериментах при регистрации ПД в контроле ДПД90 и ДПД50 составили в МПП новорожденных крыс 59 ± 3 мс и 16 ± 2 мс соответственно ($n=8$), тогда как в ЛП — 92 ± 4 мс и 64 ± 2 мс соответственно ($n=6$). ДПД90 и ДПД50 в препаратах МПП и ЛП взрослых крыс составляла $41,3 \pm 3$ мс и $13,6 \pm 2$ мс (МПП) ($n=7$)

Вследствие этого он может оказывать разнонаправленное действие на кардиомиоциты в зависимости от того, вклад какого типа рецепторов преобладает. В ряде работ показано, что для сердца грызунов, и в частности, крыс, характерна высокая плотность α_1 -адренорецепторов, которая может на порядок превышать плотность этих рецепторов у других животных [12]. Поэтому в нашей работе мы исследовали влияние селективного агониста α_1 -адренорецепторов ФЭ на длительность ПД.

В экспериментах с регистрацией вызванных электрической стимуляцией ПД 10 мкМ ФЭ, вызывал увеличение длительности ПД у обеих возрастных групп животных как в ЛП, так и в МПП (рис. 1). Так, в МПП взрослых крыс ДПД50 и ДПД90 изменялись соответственно до $116 \pm 5\%$ и $113 \pm 4\%$ ($p < 0,05$, $n=7$) от контрольных значений. В миокарде ЛП значения ДПД50 и ДПД90 увеличивались до $109 \pm 3\%$ и $110 \pm 3\%$ ($p < 0,05$, $n=6$). В МПП новорожденных крыс

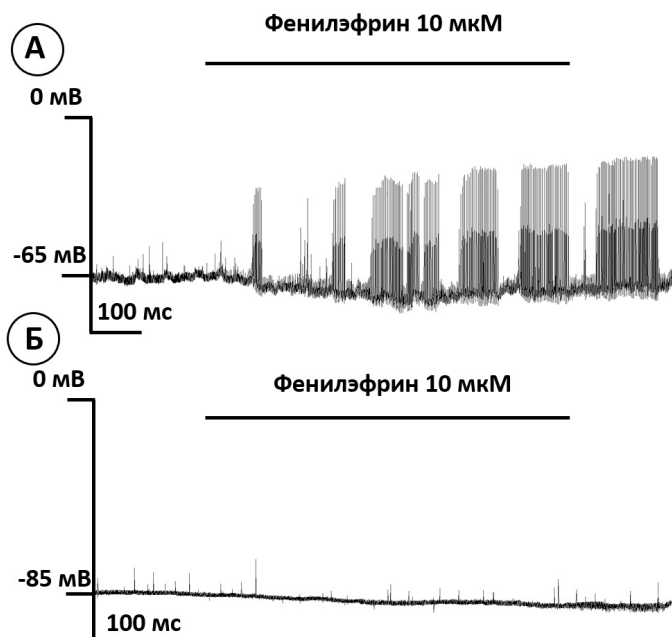


Рис. 2. Репрезентативный пример регистрации потенциала покоя и спонтанных ПД при действии фенилэфрина (10 мкМ) в многоклеточных изолированных препаратах межпредсердной перегородки (А) и отсутствии автоматии в левом предсердии (Б) сердца взрослой крысы

ФЭ увеличивал ДПД50 до $120 \pm 4\%$ ($p < 0,05$, $n=8$), а ДПД90 — до $110 \pm 4\%$ ($p < 0,05$) от контроля (рис. 1В), в то время как в ЛП оба параметра значимо не изменялись ($p > 0,05$, $n=6$) (рис. 1Б).

На сегодняшний день отсутствуют данные о формировании пейсмекерной активности в МПП у грызунов. В наших экспериментах на

изолированной МПП как взрослых ($n=6$), так и новорожденных ($n=6$) крыс ФЭ вызывал негативный сдвиг ПП в препаратах без электрической стимуляции у новорожденных крыс в среднем на $8 \pm 0,5$ мВ от контрольных значений, а в препаратах взрослых крыс — на $7,5 \pm 0,9$ мВ от контрольных значений. Также под действием ФЭ происходило возникновение нерегулярной спонтанной активности в виде серий ПД. При отмыве от ФЭ очаги, потенциально проявляющие аритмогенную активность, сохранялись у животных обеих возрастных групп (рис. 2А). В препаратах ЛП исследуемых животных (новорожденные — $n=6$; взрослые — $n=6$) подобных эффектов действия ФЭ зарегистрировано не было (рис. 2Б). В ряде работ показано, что активация β -адренорецепторов приводит к гиперполяризации, которая не сопровождается спонтанными ПД в участках миокарда, имеющих низкий уровень ПП, но не относящихся к узлам автоматии [13]. Поэтому мы предполагаем, что именно активация α_1 -адренорецепторов и их внутриклеточных сигнальных каскадов может лежать в основе спонтанной активности, наблюдаемой при адренергической стимуляции в МПП.

Подобное действие ФЭ на сердце было продемонстрировано и в других работах [14]. Как известно, α_1 -адренорецепторы сопряжены с $G_{q/11}$ -белком. α -Субъединица данного белка активирует фосфолипазу С, что приводит к уменьшению содержания в плазматической мембране фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PIP_2) и, как следствие, к уменьшению актив-

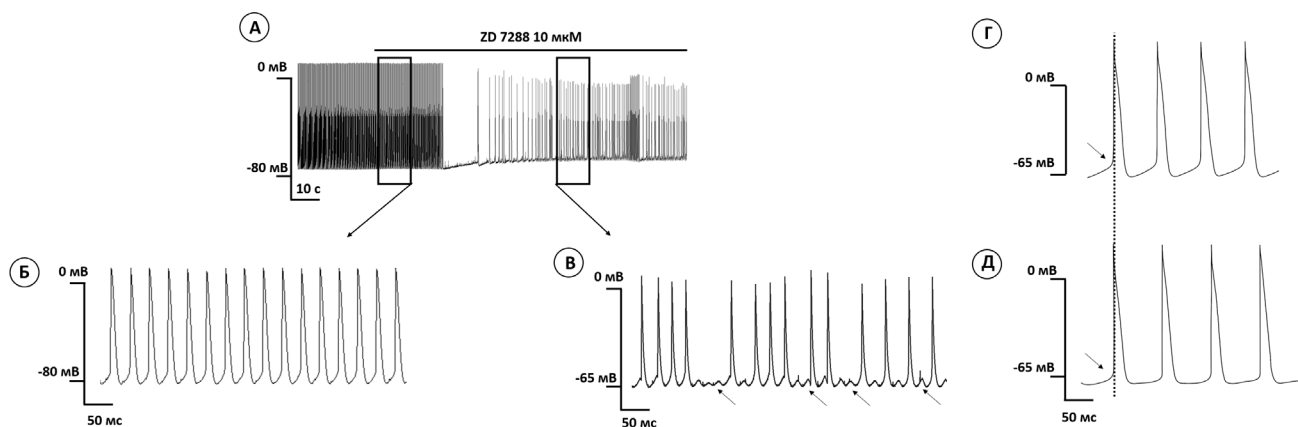


Рис. 3. Влияние блокатора тока I_T , активирующегося гиперполяризацией, ZD 7288 (10 мкМ) на индуцированные ФЭ потенциалы действия в МПП крысы. А — ZD 7288 подавляет регулярную автоматию в МПП взрослой крысы, вызывая пачечную активность. Б — примеры ПД в МПП взрослой крысы до аппликации ZD 7288. В — примеры пачечной активности в МПП взрослой крысы. Стрелками указаны осцилляции мембранного потенциала («пост-деполяризации»). Г — примеры спонтанных пейсмекерных ПД (вызванных инициацией ФЭ) в миокарде МПП у новорожденных животных, стрелкой указано изменение скорости медленной диастолической деполаризации. Д — изменение конфигурации ПД при воздействии ZD 7288 (10 мкМ) на спонтанные ПД в МПП у новорожденных крыс. Стрелкой указано изменение скорости медленной диастолической деполаризации. В экспериментах ZD 7288 подавали без наложения на ФЭ

ности каналов калиевого тока аномального выпрямления I_{K1} [15, 16]. Ток I_{K1} вносит существенный вклад в поддержание ПП в кардиомиоцитах [17], но вместе с тем участвует в обеспечении реполяризации [18]. Следовательно, подавление I_{K1} будет приводить к замедлению реполяризации и увеличению длительности ПД. Кроме того, при стимуляции α_1 -адренорецепторов может происходить рост цитоплазматической концентрации кальция $[Ca^{2+}]_i$ за счет увеличения его выброса через рецепторы инозитолтрифосфата (IP_3 -рецепторы). Рост $[Ca^{2+}]_i$ приводит к усилению деполяризующей компоненты тока I_{NCX} и, как следствие, к увеличению длительности ПД [19]. Таким образом, увеличение длительности ПД в ответ на активацию α_1 -адренорецепторов в МПП может быть обусловлено такими механизмами, как подавление тока I_{K1} и активация тока I_{NCX} .

Для исследования одного из механизмов, который может играть основополагающую роль в генерации пейсмекерной активности [20] в МПП, был использован блокатор ионного тока I_f — ZD 7288 (10 мкМ). У взрослых животных ($n=5$) ZD 7288 приводил к появлению нерегулярной пачечной активности (рис. 3А–В). ZD 7288 снижал частоту генерации спонтанных ПД в пачках на $23 \pm 2\%$ по сравнению с ритмом ПД, инициированных ФЭ, и, кроме того, незначительно снижал скорость медленной диастолической деполяризации на $5 \pm 0,5\%$ в пачках ПД (от 68 ± 2 мВ/с, $p < 0,05$, $n=5$). На рис. 3В представлены примеры ПД, зарегистрированные во время действия ZD 7288.

На рис. 3Г показаны примеры пейсмекерных ПД, инициированных ФЭ, в миокарде МПП новорожденных животных. ZD 7288 приводил к снижению скорости медленной диастолической деполяризации от $62,2 \pm 5$ мВ/с до 30 ± 3 мВ/с (на $51,6\%$, $p < 0,05$, $n=6$) (рис. 3Д, указано стрелками), а также к снижению частоты генерации ПД на $4 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$, $n=6$).

Известно, что активация α_1 -адренорецепторов может приводить к выбросу Ca^{2+} через IP_3 -рецепторы, который в свою очередь может

вызвать усиление входящего тока I_{NCX} . Натриево-кальциевый обменник является антипортером, и направление генерируемого им тока зависит от мембранного потенциала (МП) и концентраций Na^+ и Ca^{2+} . При росте внутриклеточной концентрации Ca^{2+} переносчик генерирует входящий деполяризующий ток, что приводит к выведению из клетки одного иона Ca^{2+} в обмен на три иона Na^+ [21]. Деполяризующий I_{NCX} вызывает увеличение длительности ПД в ритмически активируемом предсердном и желудочковом миокарде. Кроме того, в определенный момент реполяризации I_{NCX} может сдвигать МП до значения, при котором происходит повторная активация кальциевых и натриевых потенциал-чувствительных каналов, и таким образом инициировать самовоспроизводящиеся осцилляции МП («постдеполяризации») [22]. Подобные осцилляции наблюдались и в наших экспериментах (указаны стрелками на рис. 3В).

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что агонист адренергических рецепторов ФЭ влияет на биоэлектрическую активность миокарда в ЛП и МПП как у новорожденных, так и у взрослых животных. В покоящихся препаратах МПП ФЭ индуцирует спонтанную активность у животных обеих возрастных групп, что может свидетельствовать о сохранении первичного миокарда, а значит и потенциальных зон эктопической активности в МПП. Снижение скорости медленной диастолической деполяризации, а также изменение ритма в таких участках МПП препаратом ZD 7288, указывает на наличие в миоцитах МПП крыс тока I_f , который вносит вклад в автоматическую активность основных пейсмекеров сердца млекопитающих.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №18-34-00696).

Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moorman A.F.M., Christoffels V.M. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution // Int. J. Cardiol. 2003. Vol. 83. N 4. P. 1223–1267.
2. Yanni J., Tellez J.O., Sutyagin P.V., Boyett M.R., Dobrzynski H.J. Structural remodelling of the sinoatrial node in obese old rats // J. Mol. Cell. Cardiol. 2010. Vol. 48. N 4. P. 653–662.
3. Kelly R.G., Buckingham M.E. The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart // Trends Genet. 2002. Vol. 18. N 4. P. 210–216.
4. Davis J.S., Hassanzadeh S., Winitsky S., Lin H., Satorius C., Vemuri R., Aletras A.H., Wen H., Epstein N.D. The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin

regulatory light chain phosphorylation // *Cell*. 2001. Vol. 107. N 5. P. 631–641.

5. Rentschler S., Vaidya D.M., Tamaddon H., Degenhardt K., Sassoon D., Morley G.E., Jalife J., Fishman G.I. Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system // *Development*. 2001. Vol. 128. N 10. P. 1785–1792.

6. Højgaard M.V., Holstein-Rathlou N.H., Agner E., Kanter J.K. Reproducibility of heart rate variability, blood pressure variability and baroreceptor sensitivity during rest and head-up tilt // *Blood Press. Monit.* 2005. Vol. 10. N 1. P. 19–24.

7. Moorman A.F.M., Jong F.De., Denyn M.M., Lamers W.H. Development of the cardiac conduction system // *Circ. Res.* 1998. Vol. 82. N 6. P. 629–644.

8. Moorman A.F.M., Anderson R.H. Development of the pulmonary vein // *Int. J. Cardiol.* 2011. Vol. 147. N 1. P. 182.

9. Pustovit K.B., Kuzmin V.S., Abramochkin D.V. Diadenosine tetra- and pentaphosphates affect contractility and bioelectrical activity in the rat heart via P2 purinergic receptors // *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2016. Vol. 389. N 3. P. 303–313.

10. Pustovit K.B., Potekhina V.M., Ivanova A.D., Petrov A.M., Abramochkin D.V., Kuzmin V.S. Extracellular ATP and β -NAD alter electrical properties and cholinergic effects in the rat heart in age-specific manner // *Pur. Sign.* 2019. Vol. 15. N 1. P. 107–111.

11. Hoffman B.F., Cranefield P.F. *Electrophysiology of the heart*. N.Y.: McGraw-Hill, 1960. 390 pp.

12. O'Connell T.D.O., Jensen B.C., Baker A.J., Simpson P.C. Cardiac α 1-adrenergic receptors: novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance // *Pharmacol. Rev.* 2014. Vol. 66. N 1. P. 308–333.

13. Egorov Y.V., Kuzmin V.S., Glukhov A.V., Rosenshtaukh L.V. Electrophysiological characteristics, rhythm, disturbances and conduction discontinuities under autonomic

stimulation in the rat pulmonary vein myocardium // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2015. Vol. 26. N 10. P. 1130–1139.

14. Xiao R.-P., Zhu W., Zheng M., Cao C., Zhang Y., Lakatta E.G., Han Q. Subtype-specific α_1 - and β -adrenoceptor signaling in the heart // *Trends Pharmacol. Sci.* 2006. Vol. 27. N 6. P. 330–337.

15. Reimann F., Ashcroft F.M. Inwardly rectifying potassium channels // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999. Vol. 11. N 4. P. 503–508.

16. Anumonwo J.M.B., Lopatin A.N. Cardiac strong inward rectifier potassium channels // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010. Vol. 48. N 1. P. 45–54.

17. Oliva C., Cohen I.S., Pennefather P. The mechanism of rectification of i_{K1} in canine Purkinje myocytes // *J. Gen. Physiol.* 1990. Vol. 96. N 2. P. 299–318.

18. Ibarra J., Morley G.E., Delmar M. Dynamics of the inward rectifier K^+ current during the action potential of guinea pig ventricular myocytes // *Biophys. J.* 1991. Vol. 60. N 6. P. 1534–1539.

19. Zhong M., Rees, C.M., Terentyev D., Choi B., Koren G., Karma A. NCX-mediated subcellular Ca^{2+} dynamics underlying early afterdepolarizations in IqT2 cardiomyocytes // *J. Biophys.* 2018. Vol. 115. N 6. P. 1019–1032.

20. Kapoor N., Tran A., Kang J., Zhang R., Philipson K.D., Goldhaber J. Regulation of calcium clock-mediated pacemaking by inositol-1,4,5-trisphosphate receptors in mouse sinoatrial nodal cells // *J. Physiol.* 2015. Vol. 593. N 12. P. 2649–2663.

21. Giladi M., Tal I., Khananshvil D. Structural features of ion transport and allosteric regulation in sodium-calcium exchanger (NCX) proteins // *Front. Physiol.* 2016. Vol. 7: 30.

22. Roell W., Lewalter T., Sasse P., Tallini Y.N., Choi B.R., Breitbach M., Doran R., Becher U.M., Hwang S.M., Bostani T., Von Maltzahn J. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia // *Nature*. 2007. Vol. 450. N 7171. P. 819–824.

Поступила в редакцию 14.03.2019 г.

После доработки 02.07.2019 г.

Принята в печать 08.07.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

 α_1 -ADRENORECEPTORS' ACTIVATION EFFECTS IN THE INTERATRIAL SEPTUM MYOCARDIUM IN NEWBORN AND ADULT RATSK.B. Pustovit^{1,2,*}, E.A. Malolina³¹*Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*²*Department of Physiology, Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997, Russia;*³*Laboratory of Evolutionary Biology of Development, Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova str. 26, Moscow, 119334, Russia***e-mail: k_pustovit@mail.ru*

The bioelectric properties of various forming parts of the heart undergo significant changes during pre- and postnatal ontogenesis. Nevertheless, the early stages of embryogenesis determine not only the general scheme of the structure of the heart, but also the features of bioelectric activity in various parts of the mature heart. In particular, the presence of a myocardium with is similar to pacemaker was shown by histological methods in the interatrial septum (AS) of the mammalian heart. However, the electrical activity in this structure remains unexplored. The purpose of this work was to study the ability of AS to generate spontaneous action potentials (AP), as well as to study the effects of adrenergic effects on the bioelectric activity of heart AS. For this, the resting potential and AP were recorded using standard microelectrode techniques in multicellular perfused isolated AS and left atrium preparations obtained from the rat heart at the end of the first day of postnatal development, as well as on the 60th day of life. In our work, α_1 -adrenomimetic phenylephrine (PE affected the configuration of AP in both AS and atrial tissue obtained from animals of both age groups. In addition, in dormant preparations, PE caused spontaneous activity in AS, but not in atrium, which may be due to fluctuations in the level of cytoplasmic calcium. With the application of a blocker current, activated by hyperpolarization (I_f), ZD7288 against the background of PE, showed us a decrease in the rate of slow diastolic depolarization of AP in AS - pacemaker cells, a decrease in frequency and the appearance of burst activity, up to complete suppression of AP generation. Thus, the myocardium of the AS in newborn rats generates spontaneous electrical activity in the absence of adrenergic stimulation, which in adult rats is a necessary condition for the appearance of the AS-pacemaker activity. The ability for spontaneous activity is highly – likely to be associated with the presence of pacemaker current I_f in cardiomyocytes of AS.

Keywords: heart, interatrial septum, pacemaker, bioelectric activity, action potential, postnatal development

Сведения об авторах

Пустовит Ксения Борисовна – науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных, биологического факультета МГУ; науч. сотр. кафедры физиологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: k_pustovit@mail.ru

Малолina Екатерина Андреевна – науч. сотр. лаборатории эволюционной биологии развития, Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-33-22; e-mail: kate.ma85@gmail.com

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 574.5(282.05+289)

ОСОБЕННОСТИ ВИДОВОЙ, ПРОСТРАНСТВЕННОЙ И ТРОФИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МАКРОБЕНТОСА В ЛАГУННЫХ ЭКОСИСТЕМАХ ЕРМОЛИНСКОЙ И НИКОЛЬСКОЙ ГУБ (КАНДАЛАКШСКИЙ ЗАЛИВ, БЕЛОЕ МОРЕ)**А. П. Столяров**

*Кафедра гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: macrobenthos@mail.ru*

Изучены особенности видовой, пространственной и трофической структуры макробентосных сублиторальных сообществ в двух прибрежных лагунных экосистемах Белого моря. Ермолинская и Никольская губа относятся к сильно заиленным лагунным экосистемам с упрощенной трофической структурой сообщества макробентоса и преобладанием трофической группы собирающих детритофагов. В сублиторали исследованных лагун было обнаружено 24 вида беспозвоночных животных, а также 4 вида морских трав и водорослей (*Zostera marina*, *Cladophora sericea*, *Fucus vesiculosus* и *Chorda tomentosa*). Наиболее высоким видовым разнообразием, общей плотностью и биомассой видовых популяций макробентоса характеризуется лагунная экосистема Ермолинской губы, а более низкими показателями — экосистема губы Никольской. В лагуне Никольской губы, лучше защищенной от морских волн и течений, наблюдалось большее развитие литоральных эвригалинных морских и солоноватоводных видов макробентоса, а в лагуне Ермолинской губы, менее отгороженной от моря, было обнаружено больше морских сублиторальных видов.

Ключевые слова: лагунные экосистемы, макробентос, видовое разнообразие, пространственное распределение, трофическая структура, Белое море

Прибрежные лагунные экосистемы относятся к мелководным, динамичным и продуктивным экосистемам, которые расположены на границе между морем и сушей. Они характеризуются переходными абиотическими условиями и своеобразными сообществами живых организмов [1–7]. Прибрежным лагунам свойствен затрудненный водообмен с внешней акваторией, они отделены порогами, наносными косами, баром и соединяются с морем (постоянно или временно) одним или несколькими узкими проливами [7]. Переходный характер этих экосистем делает их особенно уязвимыми к различного рода изменениям условий окружающей среды, — как естественным (климатическим, гидрографическим, солевого режима водоема, скорости осадконакопления), так и антропогенным (органического и химического загрязнения) [8–13]. Мониторинг этих уникальных экосистем имеет большое значение для сохранения их видового разнообразия и рационального долгосрочного использования, поэтому изучение

видовой, пространственной и трофической структуры макробентоса как одного из важнейшего компонентов лагунных экосистем является важным и весьма актуальным.

Материалы и методы

Исследование сублиторального макробентоса было проведено в двух губах лагунного типа в Кандалакшском заливе Белого моря — в губе Ермолинской и в лагунной экосистеме губы Никольской — в июле 2018 г. (рис. 1). Всего было отобрано 24 сублиторальные пробы. В Ермолинской губе пробы отбирались с 11 станций, а в Никольской — с 13.

Сублиторальный макробентос отбирали дночерпателем Экмана-Берджи с площадью захвата 0,025 м². Грунт промывали на сите с ячейей 1 мм. Промытые пробы просматривали прижизненно в лаборатории. Для расчета биомассы определяли сырой вес организмов. В некоторых случаях биомассу определяли по ранее полученным соотношениям между средними размерами

животного и его биомассой.

Параллельно со сбором гидробиологического материала проводили измерения важнейших параметров среды: соленость в придонном слое воды, характер грунта, а также глубину.

Был проведен статистический анализ данных с помощью пакетов прикладных программ PAST ver. 3.24 [14] и MS Excel 2010.

Для оценки сходства сообществ, формирующихся на разных станциях (количественные данные), проводили кластерный анализ методом среднего присоединения на основе матриц сходства Пианки [15], реализованный в пакете прикладных программ PAST:

где P_{ik} , P_{jk} — доля k -го вида для станций i и j , S — число видов.

Этот индекс мало чувствителен к различиям по редким признакам, что позволяет нивелировать влияние «хвоста» случайных видов.

При проведении кластер-анализа по каче-

$$a = \frac{\sum_{k=1}^S P_{ik} \times P_{jk}}{\sqrt{\sum_{k=1}^S P_{ik}^2 \times P_{jk}^2}},$$

ственному составу макробентоса использовали индекс сходства Сьеренсена-Дайса [16, 17]:

$$K = 2c / (a + b + 2c),$$

где c — число общих видов для станций X и Y , a и b — число видов, отмеченных лишь у одной из станций.

Для выбора приемлемой степени дробности полученных кластеров использовался критерий «значимого сходства», который рассчитывается как верхняя 95%-ная доверительная граница среднего сходства между станциями.

Результаты и обсуждение

Абиотические условия и характеристика районов исследования. Губа Никольская расположена в 5,5 км от Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова МГУ (Кандалакшский залив, 66° с.ш. и 32° в.д.), так же, как и Ермолинская губа, отделена от основного бассейна мелководным порогом и защищена от морских волн и течений косами, лудами и мелкими островами (рис. 1). Это небольшая губа, более вытянутая по сравнению с Ермолинской, больше напоминает эстуарное русло небольшой речки и почти так же заилена. Лагунная экосистема Ермолинской губы расположена восточнее губы Никольской и отделена от основного бассейна своим мелководным порогом, находится в 2,5 км от Никольской губы (рис. 1).

Исследованные экосистемы были примерно

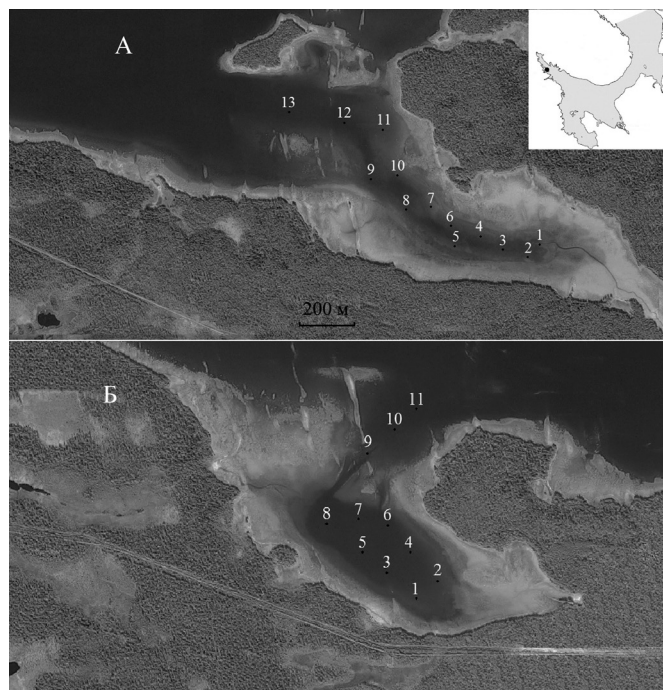


Рис. 1. Карта-схема района исследования. А — лагуна Никольской бухты, Б — лагуна Ермолинской губы. Цифрами обозначены станции

одинакового размера (500–600 м) и одинаковой глубины (максимальные глубины 4–5 м на малой воде). Надо отметить меньшие глубины кутового и центрального района Никольской губы (1–2 м на малой воде).

Сублитораль всех лагун была представлена в основном илами или песчанистыми илами — в Ермолинской губе главным образом черными илами с запахом сероводорода (показатели редокс-потенциала принимали отрицательные значения [13]) и значительным содержанием детрита (много полуразложившихся морских трав и водорослей — *Cladophora sericea* (Hudson) Kützinger, 1843, *Zostera marina* Linnaeus, 1753 и *Fucus vesiculosus* Linnaeus, 1753), а в Никольской — серыми илами, поросшими в основном *Zostera marina*. Соленость придонной воды во всех лагунах в период взятия проб была относительно высокой — 22–23‰. В кутовых районах этих лагун соленость снижалась до 21–22‰.

Видовой состав и общие показатели структуры сообщества. Всего в сублиторали исследованных лагун встречалось 24 вида беспозвоночных животных и 4 вида морских трав и водорослей (*Zostera marina*, *Cladophora sericea*, *Fucus vesiculosus*, *Chorda tomentosa* Lyngbye, 1819) (табл. 1)

При этом наибольшего видового разнообразия достигали морские полихеты (9 видов), моллюски (2 вида брюхоногих и 4 вида двустворчатых) и ракообразные (3 вида), меньше

Таблица 1

Список видов макробентоса, обнаруженных в лагунных экосистемах Ермолинской и Никольской губ летом 2018 г.

Макробентос	Лагуна Ермолинской губы	Лагуна Никольской губы
Зообентос:		
кл. Polychaeta		
1. <i>Harmothoe imbricata</i> (Linnaeus, 1767)	+	+
2. <i>Nereimyra punctata</i> (Müller, 1788)	+	+
3. <i>Pygospio elegans</i> Claparede, 1863	+	-
4. <i>Scoloplos armiger</i> (O. F. Müller, 1776)	+	+
5. <i>Alitta (Nereis) virens</i> M. Sars, 1835	+	+
6. <i>Micronephthys minuta</i> (Theel, 1879)	+	+
7. <i>Terebellides stroemi</i> Sars, 1835	+	-
8. <i>Pectinaria koreni</i> (Malmgren, 1866)	+	+
9. <i>Phyllodoce maculata</i> (Linnaeus, 1767)	+	+
кл. Oligochaeta		
10. <i>Tubificoides benedii</i> (d'Udekem, 1855)	+	+
кл. Gastropoda		
11. <i>Hydrobia ulvae</i> (Pennant, 1777)	+	+
12. <i>Cylichna alba</i> (Brown, 1827)	+	-
кл. Bivalvia		
13. <i>Mytilus edulis</i> Linnaeus, 1758	+	-
14. <i>Limecola (Macoma) balthica</i> (Linnaeus, 1758)	+	+
15. <i>Mya arenaria</i> Linnaeus, 1758	+	-
16. <i>Musculus discors</i> (Linnaeus, 1767)	+	-
кл. Crustacea		
17. <i>Gammarus duebeni</i> Lilljeborg, 1852	-	+
18. <i>Pontoporeia femorata</i> Krøyer, 1842	+	-
19. <i>Crassikorophium bonellii</i> (H. Milne Edwards, 1830)	+	-
Кл. Ascidiacea		
20. <i>Molgula griffithsii</i> (MacLeay, 1825)	+	-
кл. Insecta		
21. <i>Cladotanytarsus mancus</i> Walker, 1856	+	+
тип Nemathelminthes		
22. <i>Priapulus caudatus</i> Lamarck, 1816	+	+
тип Nemertini		
23. <i>Amphiporus lactifloreus</i> (Johnston, 1828)	-	+
24. <i>Lineus gesserensis</i> (O. F. Müller, 1774)	+	+
Макрофиты (морские травы и водоросли):		
1. <i>Zostera marina</i> Linnaeus, 1753	+	+
2. <i>Cladophora sericea</i> (Hudson) Kützing, 1843	+	+
3. <i>Fucus vesiculosus</i> Linnaeus, 1753	+	-
4. <i>Chorda tomentosa</i> Lyngbye, 1819	+	+

Примечание: «+» – наличие вида, «-» – вид не найден.

было обнаружено солоноватоводных олигохет (1 вид) и хирономид (1 вид). В сублиторали лагуны Ермолинской губы был обнаружен 21 вид беспозвоночных животных, а в лагунной экосистеме Никольской губы – всего 15 видов. Таким образом, в Никольской губе было выявлено на 6 видов меньше (30 процентов от общего списка), чем в Ермолинской, что, по-видимому, связано с ее большей мелководностью и опресненностью (особенно ранней весной, а также во время сильных дождей). Надо отметить, что в исследованных лагунах в сублиторали преобладал литорально-сублиторальный комплекс видов. Однако, если в Ермолинской губе, имеющей большую связь с морем (более широкий вход по сравнению с Никольской и меньшая защищенность от моря), наблюдалось большее развитие морских сублиторальных видов (в основном полихет, моллюсков, асцидий), то в Никольской губе, имеющей меньшую связь с морем и более защищенной от морских волн и прибоя, было выявлено больше типичных литоральных эвригалинных морских и солоноватоводных видов.

Таким образом, чем меньше была связь лагуны с морем и чем сильнее она была отгорожена от основного бассейна, тем больше наблюдалось литоральных морских эврига-

линных и солоноватоводных видов и меньше было сублиторальных морских менее эвригалинных видов.

Наиболее высоким видовым разнообразием, общей плотностью и биомассой видовых популяций характеризуется лагунная экосистема Ермолинской губы, а более низкими значениями — экосистема губы Никольской (табл. 2).

Средние показатели общей плотности и биомассы сообщества макробентоса Ермолинской губы превышали в два и более раза соответствующие значения для Никольской губы (табл. 2).

Таким образом, полученные данные по ка-

кробентосного сообщества в этих двух лагунах.

Кластер-анализ, выполненный для сублиторальных станций на уровне значимого сходства, позволяет выделить в Ермолинской губе три группы станций — кутового района (1, 2), центрального (3–5) и мористого на выходе из губы (9, 11), а также две станции (4, 10), имеющие низкое сходство с остальными, что связано с разными условиями существования гидробионтов в куту, в центральном районе и на выходе из губы (рис. 2А). В Никольской губе выделяется большая группа станций преимущественно кутового и центрального районов (3–10) и станций мористой области (12, 13, 8), расположенных на выходе из губы (рис. 2, Б), а также три станции (11, 6, 2), не имеющие значимого сходства с остальными. По качественному составу в Никольской губе идет более четкая группировка мористого района (11–13) и основной части губы (1–10). В Ермолинской губе наблюдается схожая картина.

Проведенный анализ свидетельствует о неоднородности видовой структуры макробентосного сообщества в этих двух лагунах, что связано с различными абиотическими условиями в кутовых районах (более мелководных и опресненных), в центральных частях водоема и на выходе из лагун (постоянная и мало меняющаяся соленость воды, большие глубины, преобладание мягких грунтов).

Интеграция видов в сообществе. Проведенный аналогичный кластерный анализ по видам (на основе качественных данных), позволил вы-

Общие показатели структуры макробентоса в лагунных экосистемах

Показатели	Лагуна Ермолинской губы		Лагуна Никольской губы	
	S	N	S	N
S	5,5*	0,7**	3,8*	0,5**
N, экз/м²	2074	869	569	98
B, мг/м²	44761	13682	24688	6992
H _N	1,5	0,2	1,4	0,2
E _N	0,6	0,1	0,8	0,1
H _B	1,2	0,1	0,9	0,2
E _B	0,5	0,1	0,5	0,1

Примечание: *— среднее, **— среднеквадратическая ошибка. S — число видов, N — общая плотность, B — общая биомасса, H_N — индекс Шеннона по плотности, E_N — выровненность по плотности, H_B — индекс Шеннона по биомассе, E_B — выровненность по биомассе

качественному составу и общим показателям структуры сообщества макробентоса свидетельствуют о «менее морском» характере фауны (больше литоральных солоноватоводных и морских эвригалинных видов) Никольской губы, лучше защищенной от морских волн и более отгороженной от основного бассейна по сравнению с Ермолинской, что является, по-видимому, следствием ее большей опресненности (особенно ранней весной во время снеготаяния или летом и осенью во время сильных дождей и т.д.), мелководности и заиленности.

Пространственная структура сообщества (сходство станций). Среднее сходство станций по качественному составу или по плотности видовых популяций макробентоса или по биомассе в экосистеме Ермолинской губы и лагуне губы Никольской было относительно низким (около 0,3–0,4). Это свидетельствует о неоднородности видовой структуры ма-

Таблица 2

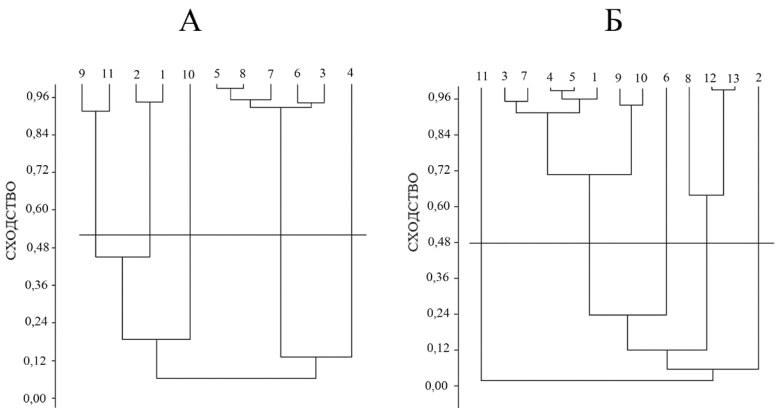


Рис. 2. Дендрограмма сходства сообществ по биомассе макробентоса Ермолинской (А) и Никольской губы (Б). Вертикальной линией показан уровень значимого сходства. Нумерация станций в лагунах согласно рис. 1

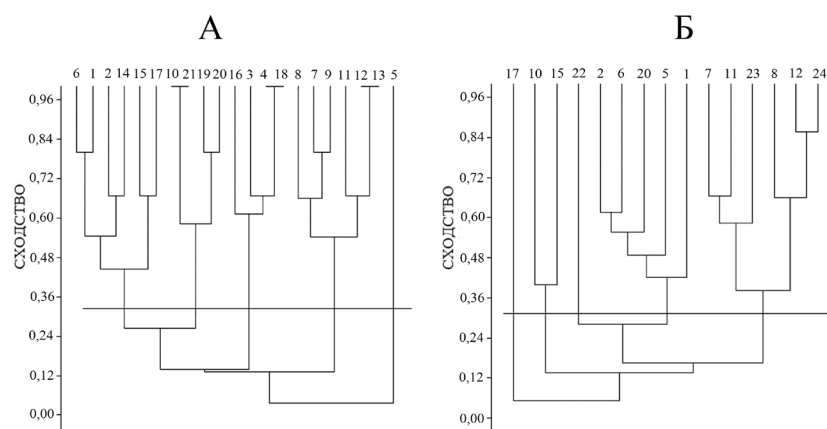


Рис. 3. Дендрограмма сходства видов по качественному составу макробентоса в Ермолинской (А) и Никольской губы (Б). Вертикальной линией показан уровень значимого сходства. 1 – *Hydrobia ulvae*, 2 – *Limecola (Macoma) balthica*, 3 – *Mytilus edulis*, 4 – *Pontoporeia femorata*, 5 – *Tubificoides benedii*, 6 – *Linaeus gesserensis*, 7 – *Nereimyra punctata*, 8 – *Scoloplos armiger*, 9 – *Terebellides stroemi*, 10 – *Pectinaria koreni*, 11 – *Harmothoe imbricata*, 12 – *Micronephthys minuta*, 13 – *Musculus discors*, 14 – *Pygospio elegans*, 15 – *Priapulus caudatus*, 16 – *Cylichna alba*, 17 – *Cladotanytarsus mancus*, 18 – *Mya arenaria*, 19 – *Molgula griffithsii*, 20 – *Phyllodoce maculata*, 21 – *Crassikorophium bonellii*, 22 – *Amphiporus lactifloreus*, 23 – *Gammarus duebeni*, 24 – *Alitta virens*

делить 4 комплекса видов в Ермолинской губе и 3 комплекса видов в Никольской, различающихся своим распространением (рис. 3). В Ермолинской губе первый комплекс видов (6–17) распространен по всей губе (при доминировании *Hydrobia ulvae* (Pennant, 1777) и *Limecola (Macoma) balthica* (Linnaeus, 1758)), он имеет преимущественное развитие в кутовом и центральном районах лагуны, второй (10–20) и третий (16–18) комплексы видов (во втором доминируют *Pectinaria koreni* (Malmgren, 1866), *Crassikorophium bonellii* (H. Milne Edwards, 1830), *Molgula griffithsii* (MacLeay, 1825), *Phyllodoce maculata* (Linnaeus, 1767), а в третьем – *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758, *Pontoporeia femorata* Krøyer, 1842, *Cylichna alba* (Brown, 1827), *Mya arenaria* Linnaeus, 1758) предпочитали центральные районы губы (третий ближе к кутовому району, а второй – к мористому) и, наконец, четвертая группа видов (8–13) преобладает в мористом районе на выходе из губы при доминировании *Terebellides stroemi* Sars, 1835, *Scoloplos armiger* (O. F. Müller, 1776), *Nereimyra punctata* (Müller, 1788), *Musculus discors* (Linnaeus, 1767), *Harmothoe imbricata* (Linnaeus, 1767) (рис. 3, А).

В Никольской губе можно выделить три комплекса видов: первый (10 – 15) преобладает в центральном районе (доминируют *Pectinaria koreni*, *Priapulus caudatus* Lamark, 1816), второй (2 – 1) – в кутовом и центральном (доминируют *Hydrobia ulvae*, *Limecola balthica*, *Tubificoides benedii* (d'Udekem, 1855)), а третий (7 – 24) – в мористом районе на выходе из лагуны (доминируют *Nereimyra punctata*, *Harmothoe imbricata*, *Micronephthys minuta* (Theel, 1879), *Scoloplos armiger*, *Alitta (Nereis) virens* M. Sars, 1835, *Gammarus duebeni* Lilljeborg, 1852) (рис. 3, Б).

Таким образом, в кутовых районах обеих губ доминировали литоральные солоноватоводные и морские эвригалинные виды – *Hydrobia ulvae*, *Tubificoides benedii*, *Limecola balthica*, в центральных районах – морские эвригалинные литоральные и сублиторальные виды *Limecola balthica*, *Mytilus edulis*, *Pontoporeia femorata*, *Cylichna alba* (Brown, 1827), *Mya arenaria*, *Priapulus caudatus*, *Pectinaria koreni*, а в морском (на выходе из губ) – морские менее эвригалинные сублиторальные виды *Terebellides stroemi*, *Nereimyra punctata*, *Harmothoe imbricata*, *Musculus discors*, *Micronephthys minuta*, *Alitta virens*, *Scoloplos armiger*. Надо отметить, что в Никольской губе, которая больше отгорожена от моря, чем Ермолинская, и которая более опресненная и мелководная, чаще встречаются типичные литоральные эвритопные виды.

Трофическая структура сообщества. Макробентосные сообщества Ермолинской губы и ла-

Таблица 3

Трофическая структура сообществ макробентоса

Трофические группы	Лагуна Ермолинской губы	Лагуна Никольской губы
С, О (%)	0	0
НС (%)	3,8±1,9	0
ПС (%)	1,0±0,9	0
Д (%)	64,1±8,8	63,6±11,6
Г (%)	1,1±0,8	1,8±1,5
Х (%)	24,8±9,6	31,8±11,3
П (%)	5,2±4,9	2,8±1,8

Примечание: С, О – скобильщики, обгрызатели, НС – неподвижные сестонофаги, ПС – подвижные сестонофаги, Д – собирающие детритофаги, Г – грунтоеды (безвыборочно заглатывающие грунт), Х – хищники, П – полифаги. % – процент от общей биомассы сообщества (средние значения)

гунной экосистемы Никольской бухты характеризуются сходной трофической структурой (табл. 3).

Везде преобладает трофическая группа собирающих детритофагов (64% от общей биомассы сообщества). Таким образом, по этим показателям и Ермолинская и Никольская губы относятся к значительно отгороженным от моря лагунам с повышенным содержанием органического вещества в осадках, где преобладают комплексы морских эвригалинных и солоноватоводных видов с упрощенной трофической структурой сообщества.

Наши исследования показывают, что Никольская губа по сравнению с Ермолинской характеризуется меньшим видовым разнообразием и более низкими показателями общей плотности и биомассы сообщества макробентоса. Проведенный кластерный анализ свидетельствует о неоднородности видовой структуры макробентосных сообществ в этих двух лагунах. В кутовых районах (более мелководных и опресненных) преобладали в основном литоральные солоноватоводные и морские эврига-

линные виды, в центральных районах — морские эвригалинные литоральные и сублиторальные виды, а на выходе из лагун (постоянная и мало меняющаяся соленость воды, большие глубины, преобладание мягких грунтов) доминировали морские менее эвригалинные сублиторальные виды. Надо отметить, что в Никольской губе, более отгороженной от моря и соответственно более опресненной и мелководной, значительное развитие получают литоральные эвритопные виды. В целом, лагунные экосистемы Ермолинской и Никольской губ можно отнести к сильно заиленным лагунам с преобладанием трофической группы собирающих детритофагов. Такие экосистемы находятся под влиянием органической нагрузки и солености.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №18-04-00206а).

Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McLusky D.S., Elliott M.* Transitional waters: a new approach, semantics or just muddying the waters? // *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 2007. Vol. 71. N 3. P. 359–363.
2. *De Wit R.* Biodiversity of coastal lagoon ecosystems and their vulnerability to global change // *Ecosystems Biodiversity* / Eds. O. Grillo and G. Venora. IntechOpen Publisher, 2011. P. 29–40.
3. *Basset A., Elliott M., West R.J., Wilson J.G.* Estuarine and lagoon biodiversity and their natural goods and services // *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 2013. Vol. 132. P. 1–4.
4. *Stolyarov A.P.* Some features of the macrobenthos community structure in estuary ecosystems (Kandalaksha bay, the White Sea) // *Biol. Bull. Rev.* 2013. Vol. 3. N 6. P. 505–521.
5. Комплексные исследования Бабьего моря, полуизолированной беломорской лагуны: геология, гидрология, биота — изменения на фоне трансгрессии берегов (Труды Беломорской биостанции МГУ. Т.12.) / Под общ. ред. В.О. Мокиевского, А.И. Исаченко, П.Ю. Дгебуадзе и А.Б. Цетлина. М.: Т-во научных изданий КМК, 2016. 243 с.
6. *Столяров А.П., Мардашова М.В.* Особенности структуры и разнообразие сообществ макробентоса в прибрежных лагунных экосистемах (Кандалакшский залив, Белое море) // *Бюл. МОИП. Отд. Биол.* 2017. Т. 122. № 3. С. 18–27.
7. *Kjerfve B.* Coastal lagoons // *Coastal lagoon processes.* Elsevier Oceanography Series / Ed. B. Kjerfve. Amsterdam: Elsevier, 1994. P. 1–8.
8. *Montagna P.A., Palmer T.A., Pollack J.B.* Hydrological changes and estuarine dynamics. Springer Briefs in Environmental Science, vol. 8. N.Y.: Springer, 2013. 94 pp.
9. *Khlebovich V.V.* Applied aspects of the concept of critical salinity // *Biol. Bull. Rev.* 2015. Vol. 5. N 6. P. 562–567.
10. *Labay V.S., Kurilova N.V., Shpilko T.S.* Seasonal variability of macrozoobenthos in a lagoon having a periodic connection with the sea (Ptich'e Lake, southern Sakhalin) // *Biol. Bull.* 2016. Vol. 43. N 9. P. 988–1002.
11. *Angus S.* Scottish saline lagoons: Impacts and challenges of climate change // *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 2017. Vol. 198. N B. P. 626–635.
12. *De Wit R., Balavoine J., Rey-Valette H., Lifran R., Ouisse V.* Restoration ecology of coastal lagoons: new methods for the prediction of ecological trajectories and economic valuation // *Aquat. Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst.* 2017. Vol. 27. N 1. P. 137–157.
13. *Stolyarov A.P.* Peculiarities of the structure of and trends in the macrobenthos community of the Ermolinskaya bay lagoon ecosystem, Kandalaksha bay, White Sea // *Biol. Bull.* 2017.

Vol. 44. N 9. P. 1019–1034.

14. *Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D.* PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontol. Electron.* 2001. Vol. 4. N 1. P. 1–9.

15. *Pianka E.R.* Niche overlap and diffuse competition // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1974. Vol. 71. N 5. P. 2141–2145.

16. *Sørensen T.A.* A method of establishing

groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analysis of the vegetation on Danish commons // *Kngl. Dan. Videnskab. Selskab., Biol. Skr.* 1948. Vol. 5. N 4. P. 1–34.

17. *Dice L.R.* Measures of the amount of ecologic association between species // *Ecology.* 1945. Vol. 26. N 3. P. 297–302.

Поступила в редакцию 28.03.2019 г.

После доработки 10.06.2019 г.

Принята в печать 28.06.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

SOME FEATURES OF THE SPECIES, SPATIAL AND TROPHIC STRUCTURE OF MACROBENTHOS IN THE LAGOON ECOSYSTEMS OF THE ERMOLINSKAYA AND NIKOLSKAYA LIPS (KANDALAKSHA BAY, WHITE SEA)

A.P. Stolyarov

*Department of Hydrobiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: macrobenthos@mail.ru*

The features of species, spatial and trophic structure of macrobenthic sublittoral communities in two coastal lagoon ecosystems of the White sea are studied. Ermolinskaya and Nikolskaya Lips belong to the heavily silted lagoons with simplified trophic community structure of macrobenthos and the predominance of collecting detritus feeders. In sublittoral of lagoons studied were found 24 species of invertebrates, as well as 4 types of sea grasses and algae (*Zostera marina*, *Cladophora sericea*, *Fucus vesiculosus* and *Chorda tomentosa*). The lagoon ecosystem of Ermolinskaya Lip is characterized by the highest species diversity, total density and biomass of macrobenthos, and the lower indicators – the ecosystem of Nikolskaya Lip. In the lagoon of Nikolskaya Lip, better protected from sea waves and currents, there was a greater development of littoral eurygaline marine and brackish species of macrobenthos, and in the lagoon of Ermolinskaya Lip, less fenced off from the sea, more marine sublittoral species were found.

Keywords: *lagoon ecosystems, macrobenthos, species diversity, spatial distribution, trophic structure, White Sea*

Сведения об авторе

Столяров Андрей Павлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-939-25-73; e-mail: *macrobenthos@mail.ru*.

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 612.825.1

**КОРТИКОСПИНАЛЬНАЯ ВОЗБУДИМОСТЬ ЧЕЛОВЕКА ПРИ
ПРЕДСТАВЛЕНИИ ДВИЖЕНИЙ В СОПРЯЖЕНИИ
С ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЕЙ****Л.В. Яковлев^{1,*}, Н.В. Сыров¹, Е.Ю. Морозова¹, А.Я. Каплан^{1,2}**

¹*Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234,
г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*

²*Центр биоэлектрических интерфейсов, институт когнитивных нейронаук, Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»,
Россия, 101000, г. Москва, Мясницкая, 13, стр. 4
e-mail: lejackovlev@gmail.com

В исследовании с участием 18 здоровых испытуемых-добровольцев изучалось влияние функциональной электростимуляции, вызывающей сгибание кисти, на кортикоспинальную возбудимость при представлении движений и в состоянии покоя. Было показано, что совместное действие функциональной электростимуляции и кинестетического представления движений приводит к увеличению амплитуд моторных ответов, вызванных одиночной транскраниальной магнитной стимуляцией. При этом в состоянии двигательного покоя данного эффекта получено не было. Поскольку изменение кортикоспинальной возбудимости на корковом уровне может влиять на процессы пластической реорганизации, необходимые для восстановления двигательных функций после инсультов и иных нейротравм, результаты данной работы имеют прямой практический потенциал. В частности, обсуждается возможность создания эффективных тренажерных комплексов для восстановления двигательных функций на базе интерфейсов мозг-компьютер, основанных на представлении движений с функциональной электростимуляцией в качестве сенсомоторной обратной связи. Проведение реабилитации с использованием таких тренажерных комплексов поможет пролить свет на механизмы двигательного восстановления, в основе которых лежат явления нейропластичности, обусловленные изменением уровня возбудимости нейронов сенсомоторных областей коры.

Ключевые слова: *транскраниальная магнитная стимуляция, представление движений, кортикоспинальная возбудимость, функциональная электростимуляция, нейрореабилитация, моторные вызванные потенциалы*

Известно, что мысленное представление движения тем или иным образом облегчает формирование двигательных координаций — по крайней мере, на корковом уровне [1]. Этот эффект в виде идеомоторных тренировок используется в тренировочном процессе в спорте и для восстановления движений в реабилитационной медицине [2–4]. Однако исследования, проводимые в данной области, показывают, что эти тренировки далеко не всегда являются эффективными для достижения спортивных или терапевтических результатов [5, 6]. В немалой степени это связано с трудностью для многих людей сохранять яркость и устойчивость мысленных образов при многократном их воспроизведении, а нередко и при самом выборе мыс-

ленного образа движения [7]. В этой связи актуальными являются поиски методик дополнительной потенциации кортикоспинальной возбудимости для повышения эффективности идеомоторных тренировок. Одним из таких подходов может быть сопряженная с представлением движения, например, правой рукой, функциональная электростимуляция (ФЭС) той же руки, приводящая к реальному движению, подобному воображаемому [8]. Основанием к такому аддитивному эффекту ментальной и физической «стимуляции» может быть и существование «зеркальных систем» нейронов, активирующихся при одном только наблюдении за движением [9], и запуск обратной афферентации от мышечных веретен и кожных рецепто-

тельно референтного электрода CP10, расположенного над мастоидным отростком левой височной кости. Контактное сопротивление для каждого из электродов не превышало 20 кОм. Сигнал фильтровался в диапазоне 0,1–60 Гц с применением фильтра-режектора сетевой наводки (50 Гц). Визуализация и регистрация ЭЭГ-сигнала, а также предъявление стимулов осуществлялись в программной среде BCI-2000 [17].

ТМС осуществлялась с использованием транскраниального магнитного стимулятора НейроМС/Д («Нейрософт», Иваново). Для оценки уровня кортикоспинальной возбудимости одиночные бифазные магнитные стимулы наносились в область левой первичной моторной коры (M1) в точку с максимальной амплитудой МВП. Стимуляция осуществлялась с интенсивностью, равной 120% относительно порога возникновения моторного ответа в состоянии покоя для поверхностного сгибателя пальцев правой руки. Определение порога возникновения моторных ответов осуществлялось индивидуально при подготовке к экспериментальной сессии.

ЭМГ регистрировалась с целью измерения амплитуды ТМС-индуцированных моторных ответов. Для регистрации одного канала ЭМГ использовалась пара поверхностных Ag/Cl-электродов («ED6», EasyCap GmbH, Германия; биполярные отведения). Таким образом производилась 2-канальная регистрация электрической активности мышц поверхностного сгибателя пальцев (FDS, *flexor digitorum superficialis*) на внутренней стороне предплечья и общего разгибателя пальцев (EDC, *extensor digitorum communis*) на внешней стороне. Контактные значения сопротивлений не превышали 5 кОм для каждого из каналов. Регистрация производилась с частотой оцифровки 10000 Гц с использованием усилителя биопотенциалов NVX52 («МКС», Зеленоград) в специализированной программной среде «Resonanse» (разработчики Нуждин Ю.О., Васильев А.Н.). При записи сигнал подвергался частотной фильтрации в диапазоне 100–1000 Гц с использованием цифрового фильтра Баттерворта 4 порядка.

ФЭС осуществлялась одноканально, с использованием токового стимулятора «Нейро-МВП» («Нейрософт», Иваново) и пары одноразовых стимулирующих клейких электродов 5х5 см, устанавливаемых на поверхности руки испытуемого в области расположения целевой мышцы (поверхностный сгибатель пальцев правой руки). Для получения функционального сокращения мышц (сжатия кисти) использовалась ритмическая стимуляция с длительностью оди-

ночного стимула 30 мкс. Длительность стимуляции составила 3 с для каждой попытки. Амплитуда и частота стимуляции подбирались индивидуально для каждого испытуемого.

Анализ данных. Перед проведением группового анализа данные обрабатывались индивидуально для каждого испытуемого. Уровень кортикоспинальной возбудимости оценивался как амплитуда МВП (пик-пик) поверхностного сгибателя пальцев, вызываемых посредством ТМС. Значения амплитуд МВП для каждого из состояний ($n=20$) были представлены в милливольттах. Индивидуальные выборки для каждого из экспериментальных условий проверялись на наличие выбросов, после чего очищенные данные проходили тесты на нормальность распределения (Шapiro-Уилка, Колмогорова-Смирнова, Андерсона-Дарлинга и Пирсона). В случае, если было пройдено ($p>0,05$) два или более тестов, распределение считалось нормальным, и для последующих сравнений применялись параметрические критерии. В противном случае для сравнения использовались непараметрические критерии. Для сравнения базового уровня амплитуд МВП при представлении движений и покое использовались парные критерии для несвязанных выборок (t -тест, тест Манна-Уитни). Для сравнения амплитуд МВП до и после ФЭС по сравнению с референтным состоянием использовались методы однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Данна на множественные сравнения. В случае непрохождения теста на нормальность распределения у испытуемых использовался непараметрический критерий Краскела-Уоллиса.

При обработке ЭЭГ для каждого из состояний сигнал разделялся на эпохи ($n=200$) длительностью 2 с. В эпохах анализа применялось оконное преобразование Фурье со скользящим окном (ширина окна 1 с, перекрытие 90%). Индекс десинхронизации ЭЭГ рассчитывался на основании сравнения распределений спектральной плотности мощности мю-ритмики для состояний покоя и представления движений [14]. В данной работе достижение индекса десинхронизации ЭЭГ порогового уровня служило показателем выработки навыка представления движений в обучающих сессиях.

При групповом анализе значения амплитуд моторных ответов усреднялись для каждого из условий, после чего нормировались относительно референтного состояния. Сравнимые параметры выражались как изменение в долях относительно референтного состояния, принятого за единицу. При сравнении базового уровня амплитуд МВП в начале и конце эксперимента референтным состоянием был базовый уровень

амплитуды МВП в состоянии покоя в начале эксперимента. Для сравнений до и после ФЭС при представлении движений референтным состоянием было состояние покоя. Для сравнений до и после ФЭС в состоянии покоя референтным состоянием было состояние представление движений. Для сравнений базового уровня амплитуд МВП использовался дисперсионный анализ (критерий Фридмана) с поправкой Данна на множественные сравнения. Для парных сравнений «до–после» ФЭС был использован критерий Вилкоксона для несвязанных выборок. Статистический анализ производился при помощи программного пакета Prism 8 (GraphPad). Визуализация данных осуществлялась с использованием библиотеки Seaborn для языка программирования Python.

Результаты и обсуждение

При сравнении базовых уровней амплитуд МВП в начале и конце экспериментальной сессии показано наличие статистически значимых различий (критерий Фридмана, $p < 0,0001$). Парное сравнение амплитуд МВП в двух состояниях, при представлении движения и при рассмотрении невербализуемого изображения, показало, что воспроизведение движения руки в воображении приводит к существенному и статистически значимому увеличению амплитуды МВП (поправка Данна на множественные сравнения, $p < 0,0001$), вызванных ТМС моторной области коры (рис 2). При этом следует отметить, что эффект увеличения амплитуды МВП при представлении движения не зависел (поправка Данна на множественные сравнения, $p > 0,9999$) от того, в начале или в конце экспериментальной сессии производилось тестирование (рис. 2). Это свидетельствует о том, что в период проведения основного блока тестирования состояние испытуемого существенно не менялось. В настоящей работе этот эффект служил тестом на корректность воспроизведения уже известного из работ других авторов [13–15, 18, 19] феномена увеличения кортикоспинальной возбудимости на фоне мысленного воспроизведения движения. Основной целью данной работы было изучение влияния ФЭС на возбудимость при представлении движений. В первую очередь было необходимо оценить влияние ФЭС на амплитуды моторных ответов. При проведении парных сравнений (критерий Вилкоксона для связанных выборок, доверительный интервал 95%) амплитуд МВП до и после ФЭС в состоянии покоя статистически значимых различий получено не было ($p = 0,1928$). В тоже время, при проведении парных сравнений (критерий Вилкоксона для связанных выборок, дове-

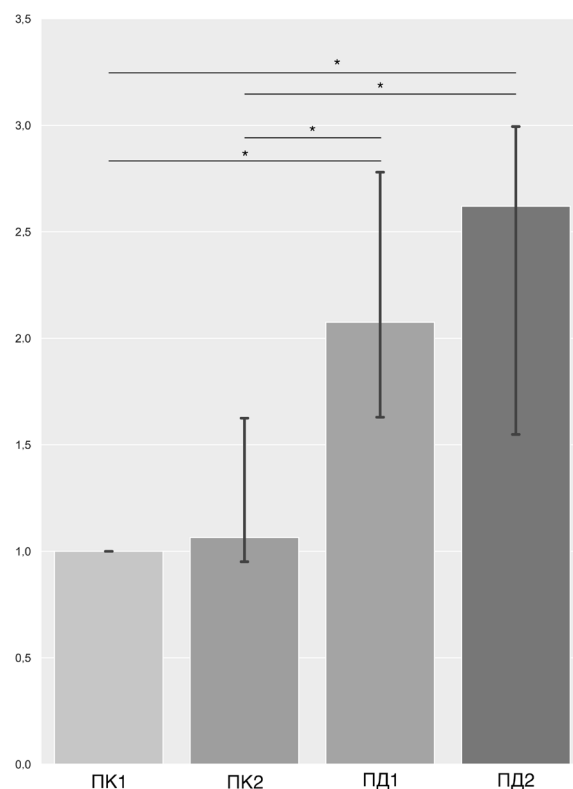


Рис. 2. Базовый уровень амплитуд МВП в покое и при представлении движений. Доли от состояния покоя (ПК1, взято за 1). ПК1, ПК2 – базовый уровень в состоянии покоя. ПД1, ПД2 – базовый уровень при представлении движений. Столбцы – медианные значения, планки погрешностей – доверительный интервал. * – критерий Фридмана с поправкой Данна на множественные сравнения, $p < 0,05$

рительный интервал 95%) до и после ФЭС на фоне представления движений были получены увеличенные ($p < 0,0001$) значения амплитуд МВП после стимуляции (рис. 3). Таким образом, можно сделать вывод о том, что представление движения совместно с ФЭС с большей эффективностью приводит к повышению кортикоспинальной возбудимости, чем изолированное воображение движения само по себе (рис. 2 и 3).

В исследовании Канеко и соавт. [8] были получены сходные результаты: чрескожная электрическая стимуляция мышц указательного пальца, сопряженная с мысленным актом представления движения, приводила к большему увеличению кортикоспинальной возбудимости, чем в каждом из условий по отдельности. Это в целом подтверждает наши данные, однако авторы указанной работы проверяли кортикоспинальную возбудимость на фоне нейро-мышечной стимуляции [8], тогда как в нашей работе возбудимость корковых нейронов оценивалась непосредственно до и после искусственной мышечной активации. Это принципиальное, на наш взгляд, методическое отличие позволило в

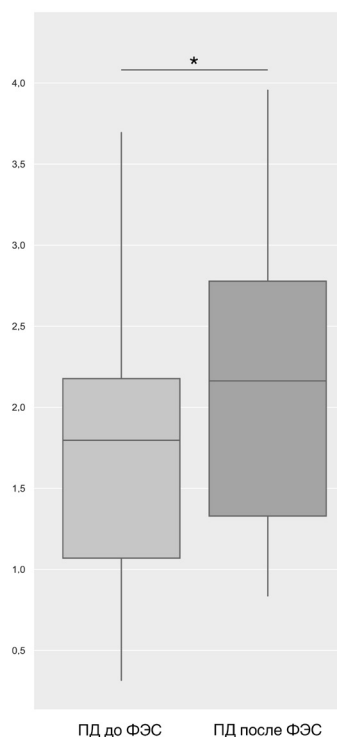


Рис. 3. Сравнение амплитуд МВП (доли от состояния покоя) при представлении движений, до и после ФЭС. Боксы — медианные значения, интерквартильный размах. Планки погрешностей — доверительный интервал. * — критерий Вилкоксона для связанных выборок, $p < 0,05$

настоящей работе установить, что аддитивное влияние представления движения и электрокожной стимуляции на возбудимость корковых нейронов формируется не за счет непосредственной периферической электрической активации эфферентно-афферентной двигательной системы, а в связи со следовыми процессами после этой стимуляции. Это обстоятельство позволяет надеяться, что многократные упражнения с представлением движения, сопряженные с предварительной электростимуляцией соответствующей конечности, могут не только усилить, но и существенно продлевать повышение состояния повышенной возбудимости

целевых корковых областей, что в свою очередь может способствовать пластическим перестройкам, способствующим процессам восстановления двигательных координаций.

Таким образом, был продемонстрирован аддитивный эффект воздействия ФЭС на кортикоспинальную возбудимость при представлении движений. В дальнейшей работе необходимо провести анализ десинхронизации мю-ритма при представлении движений, ФЭС и их совместном воздействии, а также сопоставить данные об особенностях десинхронизации с имеющимися данными об изменении уровня возбудимости сенсомоторного тракта. Кроме того, необходимо провести контрольную серию экспериментов, в рамках которой проводить ФЭС без мысленного представления движений. Несмотря на ряд вопросов, необходимых для изучения, полученные результаты позволяют рекомендовать к разработке тренажерные комплексы для восстановления движений на основе идеомоторных тренировок, в том числе и в контексте ИМК, в сопряжении с ФЭС.

Авторский коллектив выражает благодарность Ю.А. Ли за помощь в подготовке данного материала, а также А.Н. Васильеву и Ю.О. Нуждину за подготовку и техническую поддержку программного обеспечения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ЭВРИКА (грант №003/Э/03/2018).

Протокол исследования получил одобрение комиссии по биоэтике биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pfurtscheller G., Neuper C. Motor imagery activates primary sensorimotor area in humans // *Neurosci. Lett.* 1997. Vol. 239. N 2–3. P. 65–68.
2. Lotze M., Halsband U. Motor imagery // *J. Physiol. Paris.* 2006. Vol. 99. N. 4–6. P. 386–395.
3. Mizuguchi N., Nakata, H., Uchida, Y., Kanosue, K. Motor imagery and sport performance // *Jpn. J. Phys. Fit. Sport.* 2012. Vol. 1. N. 1. P. 103–111.
4. Walsh N.E., Jones L., McCabe C.S. The mechanisms and actions of motor imagery within the clinical setting // *Textbook of neuromodulation* / Eds. H. Knotkova and D. Rasche. N.Y.: Springer, 2015. P. 151–158.
5. Guerra Z.F., Lucchetti A.L.G., Lucchetti G. Motor imagery training after stroke: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled

trials // *J. Neurol. Phys. Ther.* 2017. Vol. 41. N 4. P. 205–214.

6. Li R.Q., Li Z.M., Tan J.Y., Chen G.L., Lin W.Y. Effects of motor imagery on walking function and balance in patients after stroke: a quantitative synthesis of randomized controlled trials // *Complement. Ther. Clin.* 2017. Vol. 28. P. 75–84.
7. Kaplan A.Ya. Neurophysiological foundations and practical realizations of the brain-machine interfaces in the technology in neurological rehabilitation // *Human Physiology.* 2016. Vol. 42. N 1. P. 103–110.
8. Kaneko F., Hayami T., Aoyama T., Kizuka T. Motor imagery and electrical stimulation reproduce corticospinal excitability at levels similar to voluntary muscle contraction // *J. Neuroeng. Rehabil.* 2014. Vol. 11. N. 1: 94.

9. Vogt S., Di Rienzo F., Collet C., Collins A., Guillot A. Multiple roles of motor imagery during action observation // *Front. Hum. Neurosci.* 2013. Vol. 7: 807.
10. Reynolds C., Osuagwu B.A., Vuckovic A. Influence of motor imagination on cortical activation during functional electrical stimulation // *Clin. Neurophysiol.* 2015. Vol. 126. N 7. P. 1360–1369.
11. Kurumadani H., Yoshimura M., Fukae A., Onishi K., Hayashi J., Shinomiya R., Sunagawa T. Long-term disuse of the hand affects motor imagery ability in patients with complete brachial plexus palsy // *Neuroreport.* 2019. Vol. 30. N 6. P. 452–456.
12. Saito K., Yamaguchi T., Yoshida N., Tanabe S., Kondo K., Sugawara K. Combined effect of motor imagery and peripheral nerve electrical stimulation on the motor cortex // *Exp. Brain Res.* 2013. Vol. 227. N. 3. P. 333–342.
13. Kaplan A., Vasilyev A., Liburkina S., Yakovlev L. Poor BCI performers still could benefit from motor imagery training // *Foundations of augmented cognition: neuroergonomics and operational neuroscience. AC 2016. Lecture Notes in Computer Science*, vol. 9743 / Eds. D. Schmorrow and C. Fidopiastis. Cham: Springer, 2016. P. 46–56
14. Vasilyev A., Liburkina S., Yakovlev L., Perepelkina O., Kaplan A. Assessing motor imagery in brain-computer interface training: psychological and neurophysiological correlates // *Neuropsychologia.* 2017. Vol. 97. P. 56–65.
15. Liburkina S.P., Vasilyev A.N., Yakovlev L.V., Gordleeveva S.Y., Kaplan A.Y. A motor imagery-based brain-computer interface with vibrotactile stimuli // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2018. Vol. 48. N 9. P. 1067–1077.
16. Васильев А.Н., Либуркина С.П., Каплан А.Я. Латерализация паттернов ЭЭГ у человека при представлении движений руками в интерфейсе мозг-компьютер // *Ж. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова.* 2016. Т. 66. № 3. С. 302.
17. Schalk G., McFarland D.J., Hinterberger T., Birbaumer N., Wolpaw J.R. BCI2000: a general-purpose brain-computer interface (BCI) system // *IEEE T. Biomed. Eng.* 2004. Vol. 51. N 6. P. 1034–1043.
18. Hashimoto R., Rothwell J.C. Dynamic changes in corticospinal excitability during motor imagery // *Exp. Brain Res.* 1999. Vol. 125. N 1. P. 75–81.
19. Mokienko O., Chervyakov A., Kulikova S., Bobrov P., Chernikova L., Frolov A., Piradov M. Increased motor cortex excitability during motor imagery in brain-computer interface trained subjects // *Front. Comput. Neurosci.* 2013. Vol. 7: 168.

Поступила в редакцию 16.05.2019 г.

После доработки 19.07.2019 г.

Принята в печать 23.07.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

THE CORTICOSPINAL EXCITABILITY INFLUENCED BY MOTOR IMAGERY AND SIMULTANEOUS ELECTRICAL STIMULATION

L.V. Yakovlev^{1,*}, N.V. Syrov¹, E.Y. Morozova¹, A.Y. Kaplan^{1,2}

¹*Department of Human and Animal Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

²*Center for Bioelectric Interfaces, Institute for Cognitive Neuroscience, National Research University Higher School of Economics, Myasnitskaya 13–4, Moscow, 101000, Russia*

*e-mail: lejackovlev@gmail.com

18 healthy volunteers were involved and the effect of functional neuromuscular electrical stimulation, which causes flexion of the hand, on the corticospinal excitability during motor imagery and resting state was investigated in this study. It was shown that the combined action of functional electrical stimulation and the kinesthetic representation of movements leads to an increase in the amplitudes of motor evoked potentials, caused by a single-pulse transcranial magnetic stimulation. At the same time, in the state of motor rest this effect was not obtained. Since a

change in corticospinal excitability at the cortical level may affect the processes of plastic reorganization necessary for the restoration of motor functions after strokes and other neurotraumas, the results of this work have a direct practical potential. In particular, the possibility of creating effective training complexes for the restoration of motor functions based on brain-computer interfaces, based on the presentation of movements with functional neuromuscular stimulation as a sensor-motor feedback, is discussed. Rehabilitation with the use of such training complexes will help to shed light on the mechanisms of motor recovery, which are based on the phenomena of neuroplasticity, due to changes in the level of excitability of the neurons of the sensorimotor cortex.

Keywords: *transcranial magnetic stimulation, motor imagery, corticospinal excitability, functional neuromuscular stimulation, neurorehabilitation, motor evoked potentials*

Сведения об авторах

Яковлев Лев Владимирович — аспирант лаборатории нейрофизиологии и нейрокомпьютерных интерфейсов кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-73; e-mail: lejackovev@gmail.com

Сыров Николай Владимирович — аспирант лаборатории нейрофизиологии и нейрокомпьютерных интерфейсов кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-73; e-mail: kolascoco@gmail.com

Морозова Екатерина Юрьевна — аспирант лаборатории нейрофизиологии и нейрокомпьютерных интерфейсов кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-73; e-mail: katerinakry@mail.ru

Каплан Александр Яковлевич — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, зав. лабораторией нейрофизиологии и нейрокомпьютерных интерфейсов. Тел.: 8-495-939-13-73; e-mail: akaplan@mail.ru

Правила для авторов журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология».

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: «введение», «материалы и методы», «результаты», «обсуждение результатов», «выводы», «список литературы». Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но даже в этом случае они должны содержать резюме и ключевые слова. Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97–2003 (*.doc). Объем рукописи, если в ней нет таблиц и рисунков, не должен превышать 3200 слов (шрифт Times New Roman, 12 кегль, междустрочный интервал – полуторный), включая список литературы. На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК. В следующих строках приводятся: название работы, инициалы и фамилии авторов, наименование подразделения биологического факультета МГУ, e-mail автора, ответственного за переписку с редакцией. Далее следуют резюме статьи на русском языке (100–250 слов) и ключевые слова (6–10). После текста статьи на отдельной странице печатается резюме на английском языке с заглавием и ключевыми словами (полный перевод русской версии). На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью, научная степень, должность, место работы, телефон (с кодом), e-mail.

Число таблиц и рисунков должно быть минимальным (2–3 таблицы или рисунка с соответствующим уменьшением объема текста). Подписи к рисункам и фотографиям даются на отдельной странице в конце рукописи, они должны содержать расшифровки всех используемых сокращений, а рисунки и таблицы – иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (рис. 1, табл. 2). Графические иллюстрации и фотографии (только черно-белые!) представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов (разрешение должно быть не менее 300 точек на дюйм), не допускается вставка рисунков и фотографий в основной текст. Таблицы печатаются на отдельных страницах в конце рукописи. Каждая графа таблицы должна иметь заголовок.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При ссылке на несколько источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Указатель литературы к статьям (в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту) включает от 10 до 25 ссылок, оформленных следующим образом:

- 1) **Книга:** *Holliday R.* Aging: the paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 p.
- 2) **Статья в сборнике:** *Kendeigh S.C., Dolnik V.R., Gavrilov V.M.* Avian energetic // *Granivorous birds in ecosystem* / Ed. by J. Pinowski and S.C. Kendeigh. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1977. P. 78–107.
- 3) **Статья в журнале:** *Hayflick L.* Progress in cytogerontology // *Mech. Ageing Dev.* 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.
- 4) **Тезисы докладов (материалы) конференции:** *Болеева Г.С., Борзых А.А.* Механизмы повышения адренореактивности артерий почки у крыс с инсулин-зависимым сахарным диабетом // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012», секция «Биология» (9–13 апреля 2012 г.). М.: Макс Пресс, 2012. С. 220–251.
- 5) **Автореферат диссертации:** *Борисенков М.Ф.* Биоритмы, продолжительность жизни и злокачественные новообразования у человека на севере: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Сыктывкар, 2012. 23 с.
- 6) **Электронный ресурс:** Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.05.2013).
- 7) **Электронная публикация:** *Bizzarro J.J.* Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс] // IUCN Red List of Threatened Species. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ). Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании. При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны курсивом соответствующие латинские названия (род, вид) согласно Международным кодексам номенклатуры.

Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования. Не принимаются к печати работы, которые уже опубликованы или отправлены на печать в другие издания.

Плата с авторов за публикацию не взимается.

Рукописи после рецензирования отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 2 недели, в противном случае статья будет рассматриваться как вновь поступившая.

Вся переписка с редакцией ведется по адресу vestnik@mail.bio.msu.ru. Тел. 8-495-938-27-01.

С полным текстом правил для авторов можно ознакомиться на сайте журнала – vestnik-bio-msu.elpub.ru.