

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 74 · № 4 · 2019 · ОКТЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

От редактора

Хохлов А.Н. Бессмертие зародышевой линии: бесконечная история . . . 241

Оригинальные исследования

Белевич Т.А., Ильяш Л.В., Чульцова А.Л., Флинт М.В.
Пространственное распределение планктонных пикоцианобактерий на
шельфе Карского моря, моря Лаптевых и Восточно-Сибирского моря . . . 247

Давидович О.И., Давидович Н.А., Гастиньо Р., Вит-
ковски А. Половое воспроизведение черноморской диатомовой во-
доросли *Climaconeis scalaris* (Brébisson) E.J. Cox 254

Чан К.Х. Первые данные о раковинных амёбах реки Коко провинций
Куангнам и Дананг, Вьетнам 262

Иноземцев А.Н., Бережной Д.С., Новоселецкая А.В.
Влияние диазепама, пирасетама и мексидола на условный рефлекс пас-
сивного избегания 270

Коробова А.В., Ахиярова Г.Р., Федяев В.В., Фархут-
динов Р.Г., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р. Участие сен-
сора нитратов NRT1.1 в регуляции уровня цитокининов и удлинения
корней в норме и при дефиците азота. 277

Кублановская А.А., Хапчаева С.А., Зотов В.С., Зайцев
П.А., Лобакова Е.С., Соловченко А.Е. Влияние суспен-
зии клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (Chlorophyceae)
на биологическую активность и микробиом почвы при возделывании
фасоли 284

Матвеева Д.К., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Выбор оп-
тимального протокола получения децеллюляризированного внеклеточ-
ного матрикса мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани
человека 294

Моисеенко А.В., Лойко Н.Г., Чертков О.В., Феофанов
А.В., Крупянский Ю.Ф., Соколова О.С. Анализ элемент-
ного состава ДНК-белковых кристаллов *in vitro* 301

Низовцева Е.В., Герасимова Н.С., Студитский В.М.
Влияние ацетилирования гистона H4 на дистанционные взаимодей-
ствия в хроматине 308

Солдатенко А.С., Карачевцева М.А., Шереметьев В.А., Кудряшова А.А., Архипова А.Ю., Андреев В.А., Прокошкин С.Д., Браиловский В., Мойсенович М.М., Шайтан К.В. Особенности взаимодействия <i>in vitro</i> остеоб- ластоподобных клеток MG-63 с поверхностью сплавов системы Ti-Zr- Nb, обладающих памятью формы	313
---	-----

Юзбеков А.К., Цзусюнь У. Углекислотный газообмен древесных растений в урбанизированных экосистемах	321
---	-----

Краткие сообщения

Хохлов А.Н., Моргунова Г.В., Клебанов А.А. Демографи- ческие подходы к изучению старения на клеточных культурах	328
--	-----

Указатель статей, опубликованных в журнале “Вестник Московского уни- верситета.Серия 16. Биология” в 2019 г.	334
---	-----

CONTENTS

Editorial

Khokhlov A.N. The immortality of the germ line: the neverending story. . .	241
--	-----

Research articles

Belevich T.A., Ilyash L.V., Tchultsova A.L., Flint M.V. The spatial distribution of plankton picocyanobacteria on the shelf of the Kara, Laptev, and East Siberian Seas	247
Davidovich O.I., Davidovich N.A., Gastineau R., Wit- kowski A. Sexual reproduction of the Black Sea diatom <i>Climaconeis sca-</i> <i>laris</i> (Brébisson) E.J. Cox.	254
Tran Q.H. The first data on the testate amoebae of the Coco River in the provinces of Quangnam and Danang, Vietnam	262
Inozemtsev A.N., Berezhnoy D.S., Novoseletskaya A.V. Effects of diazepam, piracetam and mexidol on passive avoidance response . .	270
Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Fedyaev V.V., Farkhutdinov R.G., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. Participation of nitrate sensor NRT1.1 in the control of cytokinin level and root elongation under normal conditions and nitrogen deficit.	277
Kublanovskaya A.A., Khapchaeva S.A., Zotov V.S., Zaytsev P.A., Lobakova E.S., Solovchenko A.E. The effect of the microalga <i>Chlorella vulgaris</i> IPPAS C-1 (Chlorophyceae) bio- mass application on yield, biological activity, and the microbiome of the soil during bean growing	284
Matveeva D.K., Andreeva E.R., Buravkova L.B. Selection of the optimal protocol for preparation of decellularized extracellular matrix of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells	294
Moiseenko A.V., Loiko N.G., Chertkov O.V., Feofanov A.V., Krupyanskii Yu.F., Sokolova O.S. Analysis of element composition of DNA-protein crystals <i>in vitro</i>	301
Nizovtseva E.V., Gerasimova N.S., Studitsky V.M. Effect of acetylation of histone H4 on communication in chromatin.	308
Soldatenko A.S., Karachevtseva M.A., Sheremetyev V.A., Kudryashova A.A., Arkhipova A.Yu., Andreev V.A., Prokoshkin S.D., Brailovski V., Moisenovich M.M., Shaitan K.V. The interaction peculiarities <i>in vitro</i> of osteoblast-like cells MG-63 with surface of Ti-Zr-Nb alloy with shape-memory	313
Yuzbekov A.K., Zuxun W. Carbon dioxide exchange of arboreal plants in urban ecosystems	321

Short communications

Khokhlov A.N., Morgunova G.V., Klebanov A.A. Demographic approaches to the study of aging on cell cultures. 328

Index of papers published in “Vestnik Moskovskogo Universiteta. Biologia” in 2019 334

ОТ РЕДАКТОРА

УДК 576.35:57.017.6

БЕССМЕРТИЕ ЗАРОДЫШЕВОЙ ЛИНИИ: БЕСКОНЕЧНАЯ ИСТОРИЯ

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: khokhlov@mail.bio.msu.ru*

Краткий обзор, посвященный проблеме «бессмертия» зародышевой линии, которая была сформулирована еще А. Вейсманом в конце XIX века. На протяжении последующих лет она привлекала внимание многих ученых-геронтологов, пытавшихся понять механизмы бесконечной передачи генетической информации из поколения в поколения с помощью половых клеток, которые, в отличие от соматических, таким образом избегают старения. Однако оставалось неясным, каким образом половые клетки женщин, представляющие собой фактически популяцию неделящихся клеток (сходную с непересеваемой клеточной культурой, претерпевающей «стационарное старение»), обеспечивают упомянутое «бессмертие» зародышевой линии. Недавно ушедший от нас выдающийся российский геронтолог Ж.А. Медведев опубликовал в 1981 г. свою блестящую работу «On the immortality of the germ line: genetic and biochemical mechanisms. A review», основные положения которой актуальны вплоть до сегодняшнего дня. В статье Медведева как раз рассматривались возможные механизмы такого «бессмертия». Они анализируются в настоящей работе и сводятся в основном к существованию целого ряда барьеров, не позволяющих в большинстве случаев потомству появиться из «старых» половых клеток (хотя определенные «омолаживающие» процессы в гаметам все-таки идут). Поэтому дети и «рождаются молодыми». Рассматриваются также некоторые альтернативные подходы к объяснению «бессмертия» зародышевой линии. Отдельное внимание уделяется «эффекту возраста родителей» и роли в этом явлении яйцеклеток и сперматозоидов.

Ключевые слова: старение, зародышевая линия, продолжительность жизни, эволюция, развитие, половые клетки, клеточная пролиферация, «стационарное старение», обзор

В организме высших животных содержится достаточное количество высокодифференцированных постмитотических клеток, в числе которых, например, нейроны, кардиомиоциты и половые клетки (ПК). Нейроны — не могут делиться, живут очень долго, теломеры нет (обновление — только очень редко с помощью стволовых/сателлитных клеток). Кардиомиоциты — не могут делиться, живут очень долго, теломеры нет (обновление — только очень редко с помощью стволовых/сателлитных клеток). Яйцеклетки — не могут делиться, живут очень долго, никогда не обновляются, теломераза есть. Сперматозоиды — не могут делиться, живут недолго, периодически обновляются с помощью стволовых клеток, теломераза есть. Можно полагать, что все вышеперечисленные клетки стареют, т.к. не могут делиться. Этот вывод базируется на нашей концепции ограничения клеточной

пролиферации как основной причины накопления с возрастом повреждений ДНК, ведущих к неблагоприятным изменениям клеток, тканей и органов, что, в свою очередь, приводит к увеличению вероятности смерти многоклеточного организма, т.е. к его старению [1–5].

В то же время, остается не очень понятным, каким образом ПК, которые, по идее, тоже должны накапливать повреждения ДНК, обеспечивают бесконечную передачу генетической информации из поколения в поколение, парадоксальным образом «ускользая» от старения.

Впервые эту проблему детально рассмотрел еще Август Вейсман в конце XIX века, сформулировав свое положение о «зародышевой плазме» (Keimplasma) [6, 7]. Вкратце оно сводится как раз к признанию существования непрерывной линии ПК (Keimbahn), переходящих из поколения в поколение. При этом ПК противопостав-

ляются все остальные — соматические, имеющие ограниченную продолжительность жизни. Роль последних, по мнению Вейсмана, сводится лишь к обеспечению ПК нормальных условий для перехода в следующее поколение, т.е. для полового размножения.

Согласно взглядам Вейсмана, «зародышевая плазма» локализована в хроматине ядра яйца. В период развития она неравномерно распределяется по соматическим клеткам в виде определенных частиц — носителей различных признаков. Эти частицы, составляющие «зародышевую плазму» (идиоплазму), Вейсман назвал детерминантами. В результате такого неравномерного распределения клетки разных органов приобретают различные детерминанты. Только в клетках, которые станут первичными ПК, сохраняется полный набор наследственных факторов, определяющих как структуру, так и функции клеток и органов данного вида. Таким образом, «бессмертны» не сами ПК, а только «зародышевая плазма», которую они содержат.

Вейсман ввел противопоставление ПК соматическим, основываясь на положении об обособлении клеток полового пути в процессе развития эмбриона — как правило, довольно раннем. Фактически он развил идеи Нусбаума [8], впервые подчеркнувшего факт раннего обособления ПК в процессе развития и высказавшего, кстати, идею о непрерывности линии этих клеток в ряду поколений, т.е. идею «зародышевого пути».

Если же у организма не происходит раннего обособления ПК, как, например, у гидры, то в этом случае мы имеем возможность наблюдать нестареющую особь. Подробно ситуация с «бессмертием» гидры была рассмотрена мной ранее [9].

В 2018 г. ушел из жизни один из самых известных русских геронтологов — Жорес Александрович Медведев. Хотя с января 1973 г. он постоянно жил и работал в Великобритании, для большинства из нас Медведев оставался именно русским ученым, который никогда не прерывал связей со своей Родиной. Когда в самом начале 1990-х годов он наконец-то получил разрешение посетить Москву, мне удалось встретиться с ним, поговорить о теориях старения и заодно подарить свою недавно опубликованную книгу «Пролиферация и старение» [1]. До сих пор с радостью вспоминаю это встречу.

Работы Ж.А. Медведева я читал на протяжении многих лет как до, так и после нашей встречи, однако одна из них [10] особенно привлекла мое внимание, т.к. была как раз посвящена давно интересовавшей меня проблеме бессмертия зародышевой линии.

Как уже неоднократно отмечалось, любая корректно сформулированная теория старения должна давать ответы на целый ряд вопросов [11], в числе которых и важнейший — как эта концепция объясняет феномен бессмертия зародышевой линии.

Многие исследователи до Медведева пытались ответить на этот вопрос, приписывая ПК, а также их предшественникам, которые и составляют зародышевую линию (надо сказать, что в современной англоязычной литературе термин *germ cells* применяется и к первым, и ко вторым), способность «ускользать» от старения с помощью различных специальных (как правило, молекулярных) механизмов. В большинстве случаев постулировалась определенная «исключительность» ПК. К необходимости такой исключительности приходили, как правило, путем уже упомянутых вкратце выше следующих рассуждений. Если старение организма является следствием, как полагают многие геронтологи, накопления в его клетках каких-то повреждений (например, повреждений ДНК), то такой процесс должен идти и в ПК. Таким образом, с увеличением числа поколений дети должны возникать из все более «старых» гамет. Не случайно одна из статей, посвященных данному вопросу, называется «Почему дети рождаются юными?» [12]. Авторы всех этих работ противопоставляют ПК соматическим клеткам, основываясь на упомянутом положении А. Вейсмана об обособлении клеток полового пути в процессе развития эмбриона (как правило, довольно раннем) [1, 13]. Однако у некоторых низших беспозвоночных ПК образуются непрерывно за счет запаса полипотентных элементов — необластов или интерстициальных клеток. У тех же организмов, у которых четко установлено раннее обособление ПК (все позвоночные и многие беспозвоночные), найдены так называемые «цитоплазматические половые детерминанты» — участки цитоплазмы оплодотворенного яйца, обогащенные крупными гранулами РНК. Из этих участков впоследствии возникают первичные гоноциты — предшественники ПК.

Если же, как уже отмечалось выше, у организма не происходит раннего обособления ПК (гидра и некоторые другие кишечнополостные), то в этом случае мы имеем возможность наблюдать нестареющую особь [9, 14].

Стареют ли ПК в организме самцов и самок млекопитающих? О том, что «качество» ПК снижается с увеличением возраста отца и матери, свидетельствует в первую очередь так называемый «эффект возраста родителей». Он выражается в том, что чем старше мать или отец,

тем выше вероятность появления у них детей с врожденными аномалиями и уродствами. При этом для яйцеклеток этот эффект выражен в гораздо большей степени, чем для сперматозоидов. И причина этого понятна. Яйцеклетки у большинства млекопитающих ведут себя как используемая нами для изучения механизмов старения непересеваемая клеточная культура [15–21]: у новорожденной самки есть ограниченное количество ПК, в случае женщин — около 300–400 тыс. (по некоторым данным — 1–2 млн [22]). Они находятся в диктиотене мейоза и «спят» в ожидании реализации своего шанса на оплодотворение, причем в течение всей жизни только 350–400 яйцеклеток получают этот шанс. Остальные яйцеклетки просто будут элиминированы. В то же время, сперматогенез у мужчин идет до самого позднего возраста, т.е. новые сперматозоиды появляются постоянно. Правда, свой путь от сперматогониев через сперматоциты и сперматиды к зрелым мужским ПК сперматозоиды проделывают в виде особой «гребенки», что затрудняет селективную элиминацию дефектных клеток. Таким образом, «гребенка» тащит вместе и хорошие, и дефектные спермии. И это плохо. Однако не исключено, что отсутствие передачи митохондриальной ДНК от отца ребенку может быть причиной того, что «эффект возраста отца» гораздо менее выражен, чем «эффект возраста матери». И это хорошо. Подробно тонкие механизмы гаметогенеза у самых разных видов рассмотрены в замечательной монографии Скотта Гилберта «Биология развития» [23]. Кстати, одна из глав этой книги называется «Сага о зародышевой линии» (The Saga of the Germ Line).

По-видимому, ПК ничем особенным от соматических клеток не отличаются, не обладают никакими специальными системами, повышающими их надежность, и в них также с возрастом накапливаются повреждения генетического материала. Более того, с эволюционной точки зрения виду, по всей видимости, невыгодно иметь устойчивые (в генетическом отношении) к неблагоприятным внешним условиям ПК. Именно их изменчивость создает материал для естественного отбора.

Согласно идеям Ж.А. Медведева (которые я полностью разделяю), у любой способной стареть особи существуют механизмы, сводящие к минимуму число повреждений (назовем их повреждениями «старческого типа»), «проскальзывающих» через естественные барьеры и реализующихся в дочернем организме. При этом это не столько системы «омоложения» ПК, сколько именно барьеры, сводящие к минимуму (или даже исключают) случаи появления на свет

потомства из гамет, несущих «старческие» изменения. По-видимому, эти системы и обеспечивают «бессмертие» зародышевой линии [1, 10, 24, 25]. Перечислю некоторые из них.

1) В ПК, обладающих гаплоидным набором хромосом, рецессивные летальные мутации, проявляющиеся на клеточном уровне, приводят к элиминации несущих эти мутации геномов.

2) Репликация ДНК, несущей «старческие» повреждения, во многих случаях становится невозможной.

3) В процессе сперматогенеза ПК «скидывают» практически весь цитоплазматический материал, а вместе с ним и накопивший повреждения аппарат трансляции.

4) Накопившиеся в ПК до начала мейоза повреждения ДНК устраняются в процессе рекомбинационной репарации. Хотелось бы заметить, что теория, согласно которой главным механизмом, обеспечивающим «бессмертие» ПК, является рекомбинационная репарация в процессе мейоза всех накопившихся повреждений ДНК [12], представляется мне не очень состоятельной. У самок млекопитающих ооциты в стадии диктиотены уже прошли профазу первого деления мейоза (лептотену, зиготену, пахитену, диплотену), то есть произошли синапсис, конъюгация хромосом и кроссинговер. Таким образом, все ооциты после рождения особи уже миновали стадию синаптонемного комплекса, на которой, собственно, и идут процессы рекомбинационной репарации. Поэтому все повреждения ДНК, которые возникают в ПК до момента их оплодотворения (а у человека этот промежуток может составлять 40–50 лет), уже не могут быть удалены с помощью мейотической рекомбинационной репарации.

5) В процессе гаметогенеза (главным образом, сперматогенеза) и раннего эмбрионального развития происходит полная реконструкция ядерного аппарата транскрипции, выражающаяся в исчезновении «старых» белков хроматина и возникновении новых — «молодых».

6) При оогенезе происходит удаление «испорченных» геномов путем перевода их в полярные тельца.

7) Существует такое явление, как атрезия — гибель части фолликулов до окончания их роста. Этот процесс контролируется гонадотропинами гипофиза через половые стероидные гормоны. Однако остается неясным, на какие клеточные элементы яичника оказывают действие стероиды в данном случае. Согласно гипотезе Гендерсона и Эдвардса [26], атрезии подвергаются фолликулы либо с генетически неполноценными ооцитами, либо с ооцитами, у которых нарушена по-

следовательность прохождения профазы мейоза. Необходимо подчеркнуть, что в норме в яичнике приматов и человека много больших фолликулов погибает и не достигает овуляции. Таким образом, в предовуляторный период большая часть крупных фолликулов подвергается атрезии. Это явление наблюдается и в яичниках у полиовулирующих животных, в том числе у мышевидных грызунов.

8) У большинства видов млекопитающих созревшая яйцеклетка очень быстро перезревает — уже через несколько часов она теряет способность к оплодотворению. Если оплодотворение все же происходит, то развитие прекращается уже на стадии первого деления дробления, после чего наблюдаются фрагментация и лизис образовавшейся структуры.

9) Процесс оплодотворения происходит таким образом, что в яйцеклетку проникает только один из наиболее жизнеспособных сперматозоидов. У дефектных спермиев практически нет шансов на успех.

10) При возникновении зиготы из аномальных ПК часто нарушается процесс эмбрионального развития.

11) Из «проскочивших» остальные барьеры ПК появляется нежизнеспособное или не способное к размножению потомство.

Несомненно, что перечень этот является далеко не полным. Для досконального выяснения механизмов, обеспечивающих «бессмертие» зародышевой линии (но не составляющих ее отдельных клеток!), необходимы интенсивные исследования довольно широкого круга специалистов.

А.В. Карнаухов и Е.В. Карнаухова в своей работе «Информационная гипотеза старения: каким образом «ускользает» от старения зародышевая линия?» [27] построили имитационную модель выживания популяции многоклеточных организмов в условиях «информационной деградации» клеточного генетического материала (накопления случайных ошибок генома). В качестве основного механизма «омоложения» (снижения числа повреждений) генетического материала при его переходе от родительских особей к их потомкам рассматриваются явление кроссинговера при гаметогенезе и последующий конкурентный отбор гамет, участвующих в формировании генетического материала потомков. Таким образом, в этой концепции объединены идеи «очистки» генома ПК в процессе их образования и идеи, основанные на представлениях о существовании специальных «барьеров», перечисленных выше. Авторы полагают, что данный механизм, существующий у большинства эукариот, обеспечива-

ет устойчивость генофонда популяции на протяжении большого числа поколений, в то время как для отдельного организма наблюдается увеличение числа ошибок (повреждений) генома с возрастом.

И последнее. В одной из своих недавних статей [28] создатель теории маргинотомии А.М. Оловников специально посвятил одну из глав проблеме «бессмертия» зародышевой линии. Глава называется «Почему дети не наследуют возраст родителей?». С одной стороны, Оловников признает, что идеи других авторов о репарации повреждений ДНК при мейотической рекомбинации (что, как уже упомянуто, не кажется мне верным) или об элиминации дефектных эмбрионов в процессе их развития (что, по-видимому, верно) имеют право на существование. С другой стороны, он предлагает свой вариант ответа на сформулированный вопрос. Оловников полагает, что все возрастные изменения организма находятся под контролем специальных структур, хрономер, которые «физически исчезают» (цитирую автора) из нейронов путем распада/деактивации этих органелл. В связи с этим соматические дефекты, возникающие в этих структурах в процессе онтогенеза, не наследуются. Что же касается «хромосомных оригиналов» различных хрономеров, то соответствующие участки хромосомной ДНК в геноме ПК постоянно находятся в гетерохроматизированном состоянии и поэтому «молчат». Поэтому геномные последовательности этих «хромосомных оригиналов», будучи максимально защищенными по сравнению с другими последовательностями генома зародышевой линии, обладают минимальным «мутационным грузом» (но ведь не нулевым? — А.Х.). Хромеры (и принтомеры) создаются в процессе индивидуального развития *de novo*, и именно поэтому дети, по мнению Оловникова, не наследуют возраст своих родителей. Только если мозг уже потерял слишком большое количество хрономеров и гомеостаз организма серьезно пострадал, возраст родителей может повлиять на качество ПК и ход эмбриогенеза. На основании всего вышесказанного Оловников заключает, что, т.к. эти соматические мини-органеллы (хромеры и принтомеры) каждый раз создаются заново с помощью строго контролируемого процесса, дети и не наследуют такой многофакторный признак, как возраст их родителей. На мой взгляд, концепция автора представляет несомненный интерес для геронтологии, однако не объясняет, каким образом из «старых» ПК, многие из которых с очевидностью несут многочисленные повреждения ДНК, без специальных систем отбора образуются организмы с «идеаль-

но молодыми» хрономерами.

Итак, судя по всему, никакого специального механизма омоложения у ПК нет (и наличие теломеразы им никак не помогает). Просто их очень здорово отбирают для продолжения рода. К сожалению, на вопрос «кто и как отбирает» у меня нет исчерпывающего ответа. Впрочем, у меня нет и ответа на вопрос, каким образом ма-

теринская клетка дрожжей производит «дочку», оставляя себе все накопленные «старческие» дефекты [29].

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, № АААА-А16-116021660098-8).

Автор заявляет об отсутствии у него конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хохлов А.Н. Пролиферация и старение // Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР, серия «Общие проблемы физико-химической биологии», том 9. М.: ВИНТИ, 1988. 176 с.
2. Khokhlov A.N. Cell proliferation restriction: is it the primary cause of aging? // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. Vol. 854. P. 519.
3. Khokhlov A.N. From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies // Biophysics. 2010. Vol. 55. N 5. P. 859–864.
4. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. Does aging have a purpose? // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 4. P. 222–224.
5. 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.
6. Weismann A. Die Kontinuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung. Jena: G. Fisher, 1885. 112 pp.
7. Weismann A. Das Keimplasma. Eine Theorie der Vererbung. Jena: G. Fisher, 1892. 628 p.
8. Nussbaum M. Zur Differenzierung des Geschlechts im Tierreich // Arch. Mikr. Anat. 1880. Vol. 18. P. 1–121.
9. Khokhlov A.N. On the immortal hydra. Again // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N 4. P. 153–157.
10. Medvedev Zh.A. On the immortality of the germ line: genetic and biochemical mechanisms. A review // Mech. Ageing Dev. 1981. Vol. 17. N. 4. P. 331–359.
11. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. Anti-aging drug discovery in experimental gerontological studies: from organism to cell and back / Aging: exploring a complex phenomenon. Ed. Sh.I. Ahmad. Boca Raton: Taylor & Francis, 2018. P. 577–595.
12. Bernstein C. Why are babies young? Meiosis may prevent aging of the germ line // Perspect. Biol. Med. 1979. Vol. 22. N 4. P. 539–544.
13. Khokhlov A.N. What will happen to molecular and cellular biomarkers of aging in case its program is canceled (provided such a program does exist)? // Adv. Gerontol. 2014. Vol. 4. N 2. P. 150–154.
14. Khokhlov A.N. Impairment of regeneration in aging: Appropriateness or stochastics? // Biogerontology. 2013. Vol. 14. N 6. P. 703–708.
15. Khokhlov A.N. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992. Vol. 663. P. 475–476.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Baker T.G. Primordial germ cells // Reproduction in mammals. Book I: Germ cells and fertilization. Eds. C.R. Austin and R.V. Short. N.Y.:

Cambridge Univ. Press, 1972. P. 1–13.

23. *Gilbert S.F.* Developmental biology, seventh edition. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2003. 750 pp.

24. *Khokhlov A.N.* Cytoogerontology at the beginning of the third millennium: From «correlative» to «gist» models // *Russ. J. Dev. Biol.* 2003. Vol. 34. N 5. P. 321–326.

25. *Khokhlov A.N.* Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // *Curr. Aging Sci.* 2013. Vol. 6. N 1. P. 14–20.

26. *Henderson S.A., Edwards R.G.* Chiasma

frequency and maternal age in mammals // *Nature*. 1968. Vol. 218. N 5136. P. 22–28.

27. *Karnaukhov A.V., Karnaukhova E. V.* Informational hypothesis of aging: How does the germ line “avoid” aging? // *Biophysics*. 2009. Vol. 54. N 4. P. 531–535.

28. *Olovnikov A.M.* Chronographic theory of development, aging, and origin of cancer: Role of chromeres and printomeres // *Curr. Aging Sci.* 2015. Vol. 8. N 1. P. 76–88.

29. *Khokhlov A.N.* Which aging in yeast is «true»? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 11–13.

Поступила в редакцию 26.07.2019 г.

После доработки 29.08.2019 г.

Принята в печать 12.09.2019 г.

EDITORIAL

THE IMMORTALITY OF THE GERM LINE: THE NEVERENDING STORY

A.N. Khokhlov

*Evolutionary Cytoogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru*

This is a short review concerning the problem of the germ line «immortality» which was already formulated by A. Weismann at the end of the 19th century. Over the following years, it attracted the attention of many gerontologists who tried to understand the mechanisms of infinite transfer of genetic information from generation to generation with the help of germ cells, which, in contrast to somatic cells, avoid aging in this way. However, it remained unclear how the germ cells of women, which are in fact a population of non-dividing cells (it is similar to stationary phase aging non-subcultured cell culture), provide the mentioned immortality of the germ line. The distinguished Russian gerontologist Zh.A. Medvedev, who passed away recently, published in 1981 his brilliant work «On the immortality of the germline: genetic and biochemical mechanisms. A review», the main points of which are relevant up to today. His paper just discusses the possible mechanisms of such «immortality». They are analyzed in detail in the current article and boil down mainly to the existence of a number of barriers that, in most cases, do not allow progeny to emerge from «old» germ cells (although certain «rejuvenating» processes in the gametes still go). Therefore, children are being «born young.» Some alternative approaches to explanation of the immortality of the germ line are also considered. Special attention is paid to «parental age effect» and the role of eggs and sperm cells in the phenomenon.

Keywords: *aging, germ line, life span, evolution, development, germ cells, cell proliferation, stationary phase aging, review*

Сведения об авторе

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 551.465

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛАНКТОННЫХ ПИКОЦИАНОБАКТЕРИЙ НА ШЕЛЬФЕ КАРСКОГО МОРЯ, МОРЯ ЛАПТЕВЫХ И ВОСТОЧНО-СИБИРСКОГО МОРЯ

Т.А. Белевич^{1,*}, Л.В. Ильяш¹, А.Л. Чульцова², М.В. Флинт³¹*Кафедра гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Северо-Западное отделение Института океанологии имени П.П. Ширшова РАН, Россия, 163061, Архангельск, наб. Сев. Двины, д.112, корп.3;*³*Институт Океанологии имени П.П. Ширшова РАН, Россия, 117997, г. Москва, Нахимовский проспект, дом 36;***e-mail: belevich@mail.bio.msu.ru*

Анализ пространственного распределения планктонных пикоцианобактерий проведен на меридиональном разрезе, проходящем через шельф Карского моря, моря Лаптевых и Восточно-Сибирского моря от 58° до 168° в.д. Численность пикоцианобактерий в Карском море составила в среднем $0,48 \pm 1,2 \cdot 10^9$ клеток/м³, в море Лаптевых — $0,16 \pm 0,24 \cdot 10^9$ клеток/м³, в Восточно-Сибирском море — $0,25 \pm 0,43 \cdot 10^9$ клеток/м³. Колебание численности пикоцианобактерий определялось наличием их аллохтонных источников — речного стока и трансформированных северо-атлантических вод. Наибольшие значения численности выявлены в районах влияния стока сибирских рек Оби, Хатанги, Индигирки и Колымы и составили $0,5 \cdot 10^9$ клеток/м³ (река Обь), $0,2 \cdot 10^9$ клеток/м³ (река Хатанга), $0,4 \cdot 10^9$ клеток/м³ (река Индигирка) и $1,6 \cdot 10^9$ клеток/м³ (река Колыма). Средний вклад пикоцианобактерий в суммарную численность и биомассу пикофитопланктона в западной части Карского моря составил 37% и 36% соответственно. В остальных исследуемых районах средний вклад пикоцианобактерий в суммарную численность фототрофного пикопланктона не превышал 7%, в суммарную биомассу — 6%. По всему массиву полученных данных выявлена высоко достоверная ($p < 0,01$) положительная связь между численностью пикоцианобактерий и температурой воды ($p = 0,003$).

Ключевые слова: *пикофитопланктон, пикоцианобактерии, Арктика, Обь, Хатанга, Индигирка, Колыма*

Пикоцианобактерии (ПЦБ, размер клеток менее 3 мкм) [1] являются существенным компонентом фитопланктона в Мировом океане [2], однако в экосистемах Арктики обилие ПЦБ невелико вплоть до их полного локального отсутствия [3, 4]. В полярных водах ПЦБ представлены преимущественно видами рода *Synechococcus*, которые являются либо автохтонными [4], либо аллохтонными формами [4–6]. Основными источниками аллохтонных ПЦБ в Арктике являются речной сток [5], североатлантические [4] и тихоокеанские воды [6]. Изменение абиотических факторов в Арктике под влиянием климатического тренда [7] — возрастание температуры поверхностного слоя, увеличение речного стока [8] и объема входящих в Аркти-

ку более теплых и соленых североатлантических вод [9], усиление стратификации и др. — приводит к повышению роли пикоформ (ПЦБ и пикозукариот) в потоках вещества в арктических экосистемах [10]. Высказано предположение о возможном возрастании доли ПЦБ в суммарном обилии пикофитопланктона в арктических водах вследствие потепления климата [11].

Сведения о количественных параметрах ПЦБ и их пространственном распределении в морях российской Арктики практически отсутствуют. Имеются данные только по эстуарию реки Лены и прилегающего района моря Лаптевых [12]. Море Лаптевых, Карское и Восточно-Сибирское моря характеризуются значительным речным стоком и поступлением североатлантических

вод [8, 13], что дает основание ожидать присутствие аллохтонных ПЦБ. Прогнозируемое возращание значимости ПЦБ в функционировании арктических экосистем и отсутствие данных по количественному развитию ПЦБ в российском секторе Арктики определило цель настоящего исследования: оценить численность и биомассу ПЦБ, их вклад в суммарные показатели обилия пикофитопланктона, а также выявить особенности пространственного распределения ПЦБ на шельфе Карского моря, моря Лаптевых и Восточно-Сибирского моря.

Материалы и методы

Материал был получен в ходе 69-го рейса научно-исследовательского судна «Академик Мстислав Келдыш» в период с 25 августа по 9 сентября 2017 г. Пробы были отобраны с поверхностного горизонта станций, расположенных на шельфе моря Лаптевых, Карского и Восточно-Сибирского морей (рис. 1). Всего отобрана и проанализирована 61 проба.

Подсчет численности фотосинтезирующих пикоформ (цианобактерий и эукариот) проводили с использованием люминесцентного микроскопа Leica DM1000 (Leica Microsystems, Германия) по методике, изложенной ранее [16], а также проточного цитометра Accury C6 (BD Bioscience, США). Использование двух методов учета обусловлено тем, что цитометр Accury C6 дает заниженные оценки численности цианобактерий [17]. Для расчета биомассы содержание углерода в клетках ПЦБ принимали равным 470 фг С на клетку [18], а в клетках пикоэукариот ($C_{кл}$) определяли по клеточным объемам ($W_{кл}$) с использованием зависимости $C_{кл} = 0,433W_{кл}^{0.863}$ [18]. Объем клеток пикоэукариот рассчитывали, исходя из объема соответствующих стереометрических фигур [19].

Для оценки сходства станций по абиотическим факторам, включающим температуру воды, соленость и концентрацию растворенного кремния (общепринятый индикатор речного стока), проводили кластерный анализ с помощью про-

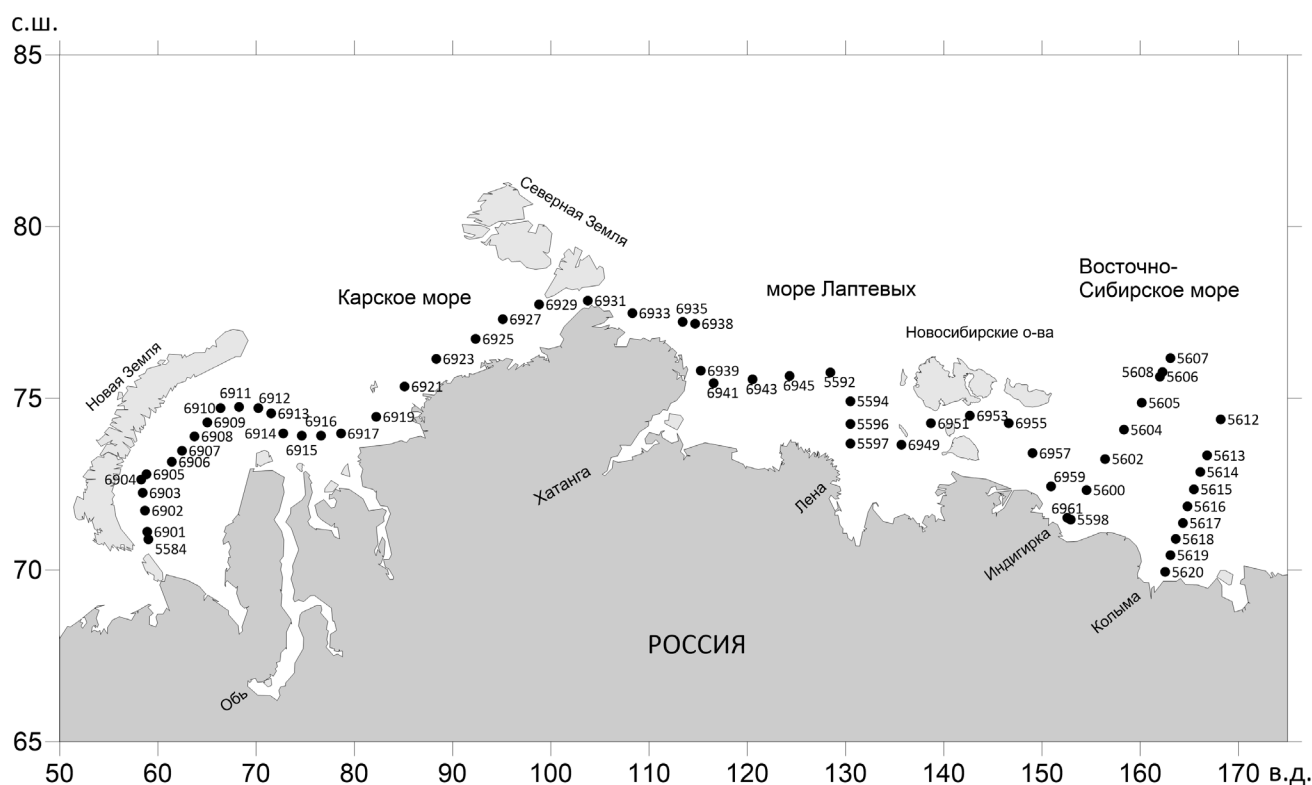


Рис. 1. Схема расположения станций

Температуру, давление и электропроводность поверхностного слоя воды определяли с помощью проточной CTD-системы, оснащенной зондом SeaBird SBE911 (Sea-Bird Scientific, США) [14]. По этим характеристикам производился расчет солености. Концентрацию растворенных форм кремния определяли колориметрически [15].

граммы PRIMER6 [20]. Для оценки зависимости между переменными рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена, достоверность различий средних значений оценивали по критерию Манна-Уитни. Расчеты проводили с использованием программы PAST 3.20 (University of Oslo, Норвегия).

Таблица

Пределы изменения температуры (T , °C), солёности (S , ‰), концентрации кремния (Si , мкмоль/л), численности ($N_{\text{ПЦБ}} \cdot 10^9$ клеток/м³) и биомассы ($B_{\text{ПЦБ}}$, мг С/м³) пикоцианобактерий, средние значения ($\pm$ стандартное отклонение) численности и биомассы цианобактерий в отдельных районах Карского моря, моря Лаптевых и Восточно-Сибирского моря и в целом в каждом из морей

Район	T	S	Si	$N_{\text{ПЦБ}}$	$B_{\text{ПЦБ}}$
Районы влияния речного стока ($P_{\text{ст}}$)	3,1–6,8	13,4–20,4	15,1–52,0	0,02–1,58 0,39 $\pm$ 0,48	0,01–0,74 0,18 $\pm$ 0,23
Морские станции ($M_{\text{ст}}$)					
М1. Западная часть Карского моря	4,2–8,1	27,4–32,0	0,4–2,0	0,04–5,50 1,15 $\pm$ 1,77	0,02–2,60 0,54 $\pm$ 0,83
М2. Пролив Вилькицкого, северная часть шельфа Восточно-Сибирского моря	-1,4–1,2	27,4 – 32	0,2–8,6	0–0,05 0,02 $\pm$ 0,02	0–0,02 0,01 $\pm$ 0,01
М3. Центральные районы шельфа трех морей	2,1–6,5	21,2–28,1	6,8–20,0	0–0,54 0,12 $\pm$ 0,14	0–0,25 0,05 $\pm$ 0,07
Карское море	-1,1–8,1	17,9–32,0	0,2–52,0	0–5,50 0,48 $\pm$ 1,2	0–2,59 0,23 $\pm$ 0,57
Море Лаптевых	1,2–5,3	13,4–29,9	1,1–29,7	0–0,85 0,16 $\pm$ 0,24	0–0,40 0,07 $\pm$ 0,11
Восточно-Сибирское море	-1,4–6,8	13,6–30,3	5,0–30,0	0–1,58 0,25 $\pm$ 0,43	0–0,74 0,12 $\pm$ 0,17

Результаты

Абиотические условия. Температура и солёность поверхностного слоя варьировали от –1,1 до 8,1°C и от 13 до 32‰ соответственно. Концентрация растворенного кремния изменялась от 0,24 до 52 мкмоль/л. Кластерный анализ сходства станций по этим абиотическим факторам выявил две группы станций (рис. 2). Одна группа включила станции с выраженным влиянием речного стока крупных сибирских рек Оби, Хатанги, Индигирки и Колымы (распресненные станции, $P_{\text{ст}}$). Поверхностный слой воды на этих станциях характеризовался повышенными значениями температуры и концентрации кремния и сниженной солёностью (таблица). Другая группа, включающая станции с менее выраженным распреснением (морские станции, $M_{\text{ст}}$), в свою очередь может быть разделена на подгруппы М1, М2 и М3. Подгруппа М1 объединила станции юго-западной части Карского моря, куда из Баренцева моря поступают солёные и относительно теплые воды, представляющие собой трансформированные североатлантические воды. Подгруппа М2 включила станции в проливе Вилькицкого и северной части Восточно-Сибирского моря, где воды характеризовались низкой температурой и

повышенной солёностью. Станции в центральных районах шельфа всех трех морей вошли в подгруппу М3.

Численность и биомасса ПЦБ. Численность ($N_{\text{ПЦБ}}$) и биомасса ($B_{\text{ПЦБ}}$) ПЦБ существенно варьировали (таблица), средние значения этих параметров между морями достоверно не раз-

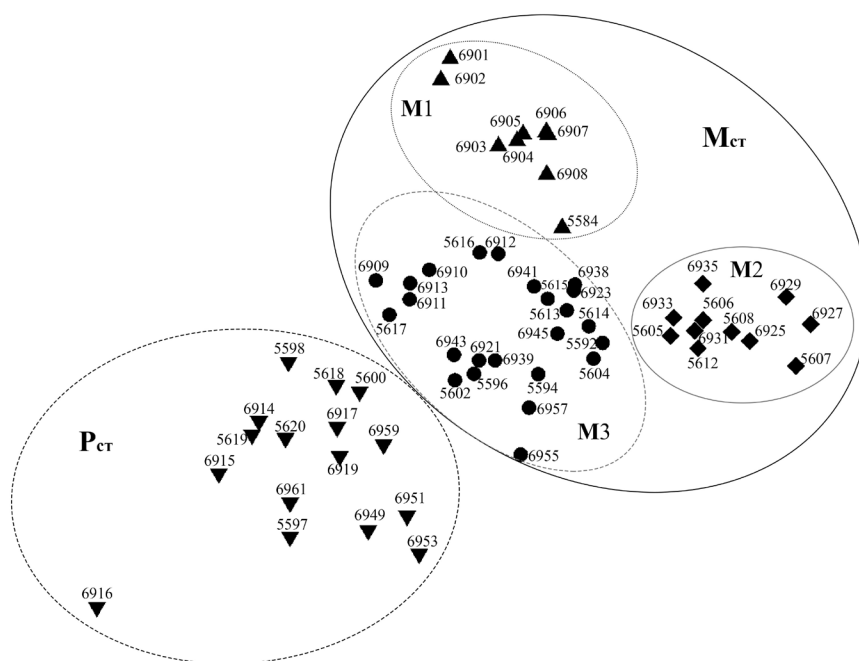


Рис. 2. Ординация станций по сходству абиотических факторов (цифры – номера станций)

личались. Наибольшие значения численности и биомассы ПЦБ выявлены в юго-западной части Карского моря (подгруппа М1) и в районах влияния речного стока (группа $P_{\text{ст}}$), однако средние

значения $N_{\text{ПЦБ}}$ и $V_{\text{ПЦБ}}$ в подгруппе М1 и группе $P_{\text{ст}}$ достоверно не различались. Средние значения $N_{\text{ПЦБ}}$ и $V_{\text{ПЦБ}}$ в подгруппе М1 и группе $P_{\text{ст}}$ были больше ($p < 0,01$), чем средние значения в холодных водах пролива Вилькицкого и северной части Восточно-Сибирского моря (подгруппа М2), а также в центральных районах шельфа (подгруппа станций М3).

Значения численности ПЦБ на акваториях с наибольшим распреснением достигали $0,5 \cdot 10^9$ клеток/м³ (сток Оби), $0,2 \cdot 10^9$ клеток/м³ (сток Хатанги), $0,4 \cdot 10^9$ клеток/м³ (сток Индигирки) и $1,6 \cdot 10^9$ клеток/м³ (сток Колымы). Широтные разрезы от эстуариев рек выявили существенное снижение численности ПЦБ в северном направлении (рис. 3А, Б). Аналогичная картина отмечена на широтном разрезе от пролива Карские ворота вдоль Новой Земли (рис. 3В).

По всему массиву полученных данных выявлена высоко достоверная ($p < 0,01$) положительная связь между численностью (и биомассой) ПЦБ и температурой воды ($p = 0,003$). Связь с соленостью воды оказалась достоверной только при уровне значимости 0,03.

Вклад ПЦБ в суммарную численность и суммарную биомассу пикоформ. Практически на всей исследованной акватории $N_{\text{ПЦБ}}$ и $V_{\text{ПЦБ}}$ были меньше таковых фотосинтезирующих пикоэукариот. Только на станциях 5584, 6901, 6902 и 6903 из подгруппы М1 в западной части Карского моря $N_{\text{ПЦБ}}$ и $V_{\text{ПЦБ}}$ были больше, чем численность и биомасса пикоэукариот, вклад ПЦБ в суммарные численность и биомассу пикоформ достигал 67–82%. Средний вклад ПЦБ в численность и биомассу пикоформ в подгруппе станций М1 составил 37% и 36% соответственно. В остальных подгруппах $M_{\text{ст}}$ и группе распресненных станций $P_{\text{ст}}$ средний вклад ПЦБ не превышал 7%.

Обсуждение результатов

Проведенные в августе–сентябре 2017 г. исследования пространственного распределения ПЦБ впервые охватили поверхностный слой шельфа сразу трех морей российской Арктики – Карского, Лаптевых и Восточно-Сибирского. Исследованная акватория характеризовалась выраженной пространственной неоднородностью водных масс, которая обусловлена такими процессами, как мощный речной сток, влиянием вод Баренцева моря, являющихся трансформированными североатлантическими водами, а также воздействием вод центрального арктического бассейна. Мезомасштабная неоднородность абиотических условий на шельфе арктических морей определила существенную изменчивость значений параметров обилия ПЦБ, на которую

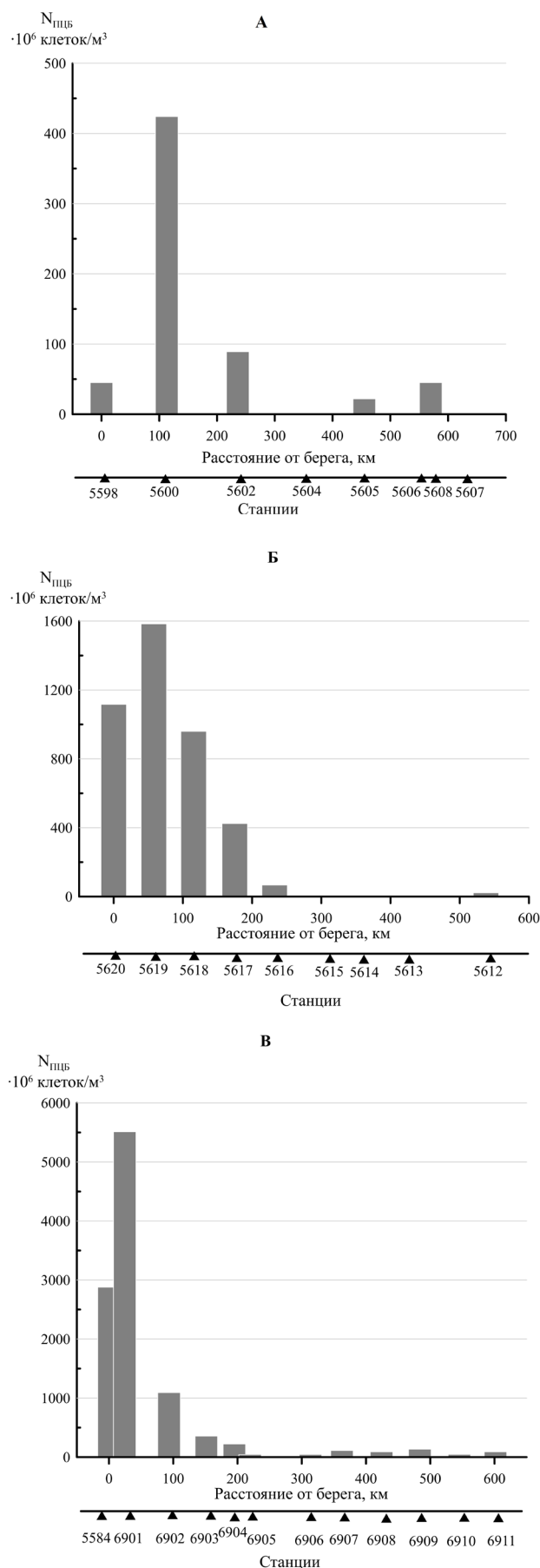


Рис. 3. Численность пикоцианобактерий ($N_{\text{ПЦБ}}$) на широтных разрезах от рек Колымы (А), Индигирка (Б) и вдоль Новой Земли (В).

накладывается временная изменчивость. В частности, объем речного стока в море Лаптевых, Карское и Восточно-Сибирское моря, а также направление распространения распресненных вод изменяются по сезону [8]. Сезонная изменчивость присуща и величине объема входящих в Арктику североатлантических вод [21]. Выявлена также межгодовая изменчивость объема речного стока и входящих атлантических вод [8, 9]. Временная изменчивость основных источников аллохтонных ПЦБ может вести к сезонной и межгодовой изменчивости численности и пространственного распределения ПЦБ на шельфе сибирских морей.

Пространственная вариабельность численности ПЦБ в основном определялась наличием источников аллохтонных ПЦБ, благодаря которым достигались наибольшие значения численности и биомассы ПЦБ. Основным источником аллохтонных ПЦБ на шельфе Карского моря, моря Лаптевых и Восточно-Сибирского моря является речной сток. По мере удаления от эстуариев рек как в широтном, так и в меридиональном направлениях численность ПЦБ существенно снижается, вследствие эффекта «разведения» и, вероятно, отмирания пресноводных форм. Аналогичная картина отмечалась и осенью в Канадской Арктике, где численность ПЦБ снижалась по градиенту: воды реки Маккензи – эстуарий – прибрежные воды моря Бофорта – открытые арктические воды [5]. Пределы варьирования численности ПЦБ в районах, подверженных влиянию речного стока ($P_{ст}$), оказались несколько меньше таковых ($0,39\text{--}2,3\cdot 10^9$ клеток/ m^3) на шельфе моря Бофорта [5]. Однако, с учетом того, что в сентябре численность ПЦБ в губе Буор-Хая, находящейся под влиянием стока реки Лена, варьирует от 1 до $40\cdot 10^9$ клеток/ m^3 [12], можно сделать вывод о соответствии пределов варьирования численности ПЦБ в российских шельфовых морях и на шельфе Канадской Арктики. Еще одним источником аллохтонных ПЦБ являются трансформированные североатлантические воды, в которых численность ПЦБ может достигать $21\cdot 10^9$ клеток/ m^3 [4]. По мере продвижения атлантических вод в арктический регион численность ПЦБ существенно снижается. Воды, поступающие из Баренцева моря в юго-западную часть Карского моря, характеризовались более высоким обилием ПЦБ (наибольшая численность – $5,5\cdot 10^9$ клеток/ m^3) по сравнению с центральными и северными районами шельфа морей Карского, Лаптевых и Вос-

точно-Сибирского.

Еще до недавнего времени считалось, что автохтонные морские ПЦБ в Арктике отсутствуют [3]. Однако метагеномные исследования выявили присутствие эндемичных морских *Synechococcus*, которые на некоторых станциях даже доминировали по числу последовательностей над аллохтонными формами [4]. Мы полагаем, что в холодных водах пролива Вилькицкого и в северной части шельфа Восточно-Сибирского моря ПЦБ представлены именно автохтонными формами, численность которых не превышает $0,05\cdot 10^9$ клеток/ m^3 . Таких же величин достигала численность ПЦБ летом в северной части Чукотского моря и в море Бофорта, однако авторы соответствующих исследований не исключали возможности адвекции ПЦБ в эти арктические районы с тихоокеанскими водами [22].

Выявленный незначительный вклад ПЦБ в суммарные численность и биомассу фотосинтезирующих пикоформ на шельфе сибирских морей согласуется с данными по другим арктическим районам [4]. Полагают, что преобладание в пикофракции эукариот обусловлено их большей приспособленностью к суровым арктическим условиям и, в частности, к варьированию солености в широком диапазоне [23] и к низкой температуре воды [24].

Температура воды является одним из основных факторов, обуславливающих макромасштабное распределение ПЦБ и в частности *Synechococcus* [25]. Пространственное распределение ПЦБ на шельфе Карского моря, моря Лаптевых и Восточно-Сибирского моря также демонстрирует положительную связь между температурой воды и численностью ПЦБ. Это свидетельствует о возможном увеличении концентрации ПЦБ в шельфовых морях Российской Арктики и повышении их роли в функционировании арктических экосистем при наблюдаемом климатическом тренде.

Работа выполнена в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова часть 2 (тема №АААА–А16–116021660052–0). При финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований выполнены экспедиционные исследования (проект № 18-05-60069 Арктика), а также обработка и анализ полученных результатов (проект № 19-05-00026а).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moon-van der Staay S.Y., Wachter R., Vault D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity // *Nature*. 2001. Vol. 409. N 6820. P. 607–610.
2. Li W.K.W. Primary production of prochlorophytes, cyanobacteria, and eucaryotic ultraphytoplankton: measurements from flow cytometric sorting // *Limnol. Oceanogr.* 1994. Vol. 39. N 1. P. 169–175.
3. Pedrós-Alió C., Potvin M., Lovejoy C. Diversity of planktonic microorganisms in the Arctic Ocean // *Prog. Oceanogr.* 2015. Vol. 139. P. 233–243.
4. Paulsen M.L., Doré H., Garczarek L., Seuthe L., Müller O., Sandaa R-A., Bratbak G., Larsen A. *Synechococcus* in the Atlantic gateway to the Arctic Ocean // *Front. Mar. Sci.* 2016. Vol. 3:191.
5. Waleron M., Waleron K., Vincent W.F., Wilmotte A. Allochthonous inputs of riverine picocyanobacteria to coastal waters in the Arctic Ocean // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007. Vol. 59. N 2. P. 356–365.
6. Cottrell M.T., Kirchman D.L. Photoheterotrophic microbes in the arctic ocean in summer and winter // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 75. N 15. P. 4958–4966.
7. IPCC: Climate Change 2013: The physical science basis, contribution of working group to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change / Eds. T.F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, and P.M. Midgley. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2013. 1535 pp.
8. Gordeev V.V. River input of water, sediment, major ions, nutrients and trace metals from Russian territory to the arctic ocean // *The freshwater budget of the arctic ocean* / Eds. E.L Lewis. Kluwer: Amsterdam, 2000. P. 297–322.
9. Polyakov I.V., Pnyushkov A.V., Alkire M.B. *et al.* Greater role for Atlantic inflows on sea ice loss in the Eurasian basin of the Arctic Ocean // *Science*. 2017. Vol. 356. N 6335. P. 285–291.
10. Blais M., Ardyna M., Gosselin M., Dumont D., Belanger S., Tremblay J-E., Gratton Y., Marchese C., Poulin. M. Contrasting interannual changes in phytoplankton productivity and community structure in the coastal Canadian Arctic Ocean // *Limnol. Oceanogr.* 2017. Vol. 62. N 6. P. 2480–2497.
11. Vincent W.F. Microbial ecosystem responses to rapid climate change in the Arctic // *ISME*. 2010. N 4. P. 1087–1090.
12. Moreira-Turcq P.F., Cauwet G., Martin J.M. Contribution of flow cytometry to estimate picoplankton biomass in estuarine systems // *Hydrobiologia*. 2001. Vol. 462. N 1–3. P. 157–168.
13. Bauch D., Torres-Valdes S., Polyakov I., Novikhin A., Dmitrenko I., McKay J., Mix A. Halocline water modification and along-slope advection at the Laptev Sea continental margin // *Ocean Sci.* 2014. Vol. 10. N 1. P. 141–154.
14. Zavialov P.O., Izhitskiy A.S., Osadchiev A.A., Pelevin V.V., Grabovskiy A.B. The structure of thermohaline and bio-optical fields in the upper layer of the Kara Sea in September 2011 // *Oceanology*. 2015. Vol. 55. N 4. P. 461–471.
15. Hansen H.P., Koroleff F. Determination of nutrients // *Methods of seawater analysis* / Eds. K. Grashoff, K. Kremling, M. Ehrhardt. Weinheim, N.Y., Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH, 1999. P. 149–228.
16. Belevich T.A., Ilyash L.V., Milyutina I.A., Logacheva M.D., Troitsky A.V. Phototrophic picoeukaryotes of Onega bay, the White Sea: abundance and species composition // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 3. P. 109–114.
17. Ribeiro C.G., Dominique M. D., dos Santos A.L., Brandini F. P., Vault D. Estimating microbial populations by flow cytometry: comparison between instruments // *Limnol. Oceanogr–Meth.* 2016. Vol. 14. N. 11. P. 750–758.
18. Verity P.G., Robertson C.Y., Tronzo C.R., Andrews M.G., Nelson J.R., Sieracki M.E. Relationship between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton // *Limnol. Oceanogr.* 1992. Vol. 37. N 7. P. 1434–1446.
19. Menden-Deuer S., Lessard E.J. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protest plankton // *Limnol. Oceanogr.* 2000. Vol. 45. N 3. P. 569–579.
20. Clarke K.R., Gorley R.N. PRIMER v6: User Manual/Tutorial. Plymouth: PRIMER–E, 2006. 192 pp.
21. Fahrbach E., Meincke J., Østerhus S., Rohardt G, Schauer U, Tverberg, V, Verduin J. Direct measurements of volume transports through Fram Strait // *Polar Res.* 2001. Vol. 20. N 2. P. 217–224.
22. Cottrell M., Kirchman D. Virus genes in Arctic marine bacteria identified by metagenomic analysis // *Aquat. Microb. Ecol.* 2012. Vol. 66. N 2. P. 107–116.
23. Waterbury J.B., Watson S.W., Valois F.W., Franks D.G. Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus* // *Photosynthetic Picoplankton* / Eds T. Platt and W.K.W. Li. Ottawa: Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., 1986. P. 71–120.
24. Lovejoy C., Vincent W.F., Bonilla S., Roy S.,

Martineau M.-J., Terrado R., Potvin M., Massana R., Pedro's-Alio' C. Distribution, phylogeny, and growth of cold-adapted picoprasinophytes in Arctic seas // J. Phycol. 2007. Vol. 43. N 1. P. 78–89.

25. Olson R.J., Zettler E.R., Armbrust E.V., Chisholm S.W. Pigment, size and distribution of

Synechococcus in the North Atlantic and Pacific oceans // Limnol. Oceanogr. 1990. Vol. 35. N 1. P. 45–58.

Поступила в редакцию 05.04.2019 г.

После доработки 25.08.2019 г.

Принята в печать 02.09.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

THE SPATIAL DISTRIBUTION OF PLANKTON PICOCYANOBACTERIA ON THE SHELF OF THE KARA, LAPTEV, AND EAST SIBERIAN SEAS

T.A. Belevich^{1,*}, L.V. Ilyash¹, A.L. Tchultsova², M.V. Flint³

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

²Northwestern Division, Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Northern Dvina Embankment, 112, Arkhangelsk, 163061 Russia;

³P.P. Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Nahimovskiy pr., 36, Moscow, 117997, Russia

*e-mail: belevich@mail.bio.msu.ru

The spatial distribution of picocyanobacteria on the arctic longitude transect passing through the shelf of the Kara, Laptev and East Siberian seas from 58° to 168° E was studied. In the Kara Sea the picocyanobacteria abundance averaged $0.48 \pm 1.2 \cdot 10^9$ cell/m³, in the Laptev Sea – $0.16 \pm 0.24 \cdot 10^9$ cell/m³, in the East Siberian Sea – $0.25 \pm 0.43 \cdot 10^9$ cell/m³. The abundance fluctuations of photoautotrophic prokaryotes were determined by the presence of allochthonous picocyanobacteria sources – river runoff and transformed North Atlantic waters. Highest abundances were observed in the areas of the runoff influence of the Siberian Rivers Ob, Khatanga, Indigirka and Kolyma and averaged $0.5 \cdot 10^9$ cell/m³ (river Ob), $0.2 \cdot 10^9$ cell/m³ (river Khatanga), $0.4 \cdot 10^9$ cell/m³ (river Indigirka) и $1.6 \cdot 10^9$ cell/m³ (river Kolyma). The average contribution of picocyanobacteria to the total abundance and biomass of picoforms in the western part of the Kara Sea was 37% and 36% respectively. In other areas, the average contribution of picocyanobacteria to the total abundance of phototrophic picoplankton did not exceed 7%, to the total biomass – 6%. A highly reliable ($p < 0.01$) positive correlation between the abundance and biomass of picocyanobacteria and the water temperature ($p = 0.003$) was revealed over the entire array of data obtained.

Keywords: picophytoplankton, picocyanobacteria, Arctic region, Ob, Khatanga, Indigirka, Kolyma

Сведения об авторах

Белевич Татьяна Алексеевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-27-91; e-mail: belevich@mail.bio.msu.ru

Ильяш Людмила Васильевна – докт. биол. наук, проф. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-2791; e-mail: ilyash@mail.bio.msu.ru

Чульцова Анна Леонидовна – науч. сотр. Северо-Западного отделения Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН. Тел: 8-8182-42-00-47; e-mail: an-2345@yandex.ru

Флинт Михаил Владимирович – академик РАН, докт. биол. наук, зав. лаборатории «Экологии планктона» института Океанологии им. П.П. Ширшова РАН. Тел: 9-499-124-8515; e-mail: m_flint@ocean.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 582.261.5+581.162

ПОЛОВОЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ ЧЕРНОМОРСКОЙ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ *CLIMACONEIS SCALARIS* (BRÉBISSON) E.J. COXО.И. Давидович^{1,*}, Н.А. Давидович^{1, 2}, Р. Гастиньо², А. Витковски²

¹Карадагская научная станция имени Т.И. Вяземского — природный заповедник РАН, филиал Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, ул. Науки, д. 24, п. Курортное, г. Феодосия, 298188, Россия;

²Institute of Marine and Environmental Sciences, University of Szczecin, Mickiewicza 16a, Szczecin, 70-383, Poland

*e-mail: olivdav@mail.ru

В лабораторных условиях инициирован и исследован процесс полового воспроизведения черноморской диатомовой водоросли *Climaconeis scalaris* (Brébisson) E.J. Cox, 1982. Система скрещивания этого вида допускает гомо- и гетероталлическое воспроизведение. Половой процесс аллогамный. Во время активного скопления друг относительно друга диплоидные материнские клетки-гаметангии выделяли слизь, образуя слизистую дорожку. Каждый гаметангий в паре продуцировал две вытянутые цилиндрические с закругленными краями гаплоидные гаметы, которые были в значительной степени морфологически и поведенчески изогамными. Деление протопласта гаметангиальной клетки происходило в трансапикальной плоскости без перегруппировки гамет. Растущие ауксоспоры располагались параллельно створкам родительских клеток. Получены данные об изменении размеров клеток, количества хлоропластов, а также положении кардинальных точек в жизненном цикле изучаемого вида.

Ключевые слова: диатомовые водоросли, *Climaconeis scalaris*, клоновые культуры, вегетативный рост, половое воспроизведение, ауксоспорообразование

Систематика рода *Climaconeis* Grunow, 1862 долгое время оставалась спорной. На сегодняшний день известно и описано 18 видов из этого рода [1]. Существенный вклад в изучение таксономии внесли Кокс [2, 3], Прасад [4] и Лоббан с соавт. [5]. Кокс в 1982 г. рассмотрела номенклатурную и таксономическую историю рода. Выполняв обширный и тщательный анализ литературных и оригинальных материалов, она обнаружила значительное структурное сходство между представителями родов *Okedenia* Eulenstein ex G.B.De Toni, 1891 и *Climaconeis* и предложила объединить их в один род *Climaconeis*, который имеет номенклатурный приоритет над *Okedenia* [3]. Большинство видов *Climaconeis* являются тропическими, и только три — *C. delicatula* (Cleve) E.J. Cox, *C. inflexa* (Brébisson ex Kützinger) E.J. Cox и *C. scalaris* — встречаются в умеренных широтах [6, 7]. Створки *Climaconeis* могут быть изогнутыми или прямыми, большинство видов легко узнаваемы в живом материале под световым микроскопом по наличию и расположению

хлоропластов характерной H-образной формы с центральным пиреноидом [2, 4].

Группа шовных пеннатных, к которой относится род *Climaconeis*, является самой большой из основных филогенетических линий диатомовых водорослей, она объединяет большинство современных видов и родов, однако системы скрещивания и даже сам процесс полового воспроизведения у 99% из них не описаны. Ни у одного из представителей рода *Climaconeis* половое воспроизведение ранее не изучалось. В данной статье мы впервые приводим данные о половом воспроизведении *C. scalaris* из Черного моря.

Материалы и методы

Естественная популяция *C. scalaris* обитает в сублиторальной зоне вблизи Карадагской биологической станции. Из проб в виде скоба обрастаний с камней, взятых с глубины 20–50 см вблизи Кузьмичева Камня (44°54'41"N, 35°12'45"E), были выделены при помощи микро-

пипетки отдельные клетки, давшие начало клоновым культурам. Культуры содержались в стеклянных чашках Петри и колбах Эрленмейера

на модифицированной среде ESAW [8] при естественном освещении со стороны северного окна и постоянной температуре 20 ± 2 °С. Изначально

клоновые культуры находились в среде, соленость которой соответствовала черноморской и составляла 18‰. Для экспериментов по скрещиванию использовали среду с более высокой соленостью (30‰), так как ранее нами было экспериментально установлено, что вид является эвригалинным и оптимумы солености для полового воспроизведения и вегетативного роста у черноморской популяции находятся вблизи 30‰. В экспериментах по скрещиванию были задействованы 24 клон. В качестве посевного материала использовали культуры в экспоненциальной стадии роста, для этого их пересевали в свежую среду каждые 5–6 сут.

Размеры клеток определяли, используя микроскоп Biolar-PI (PZO, Польша), оборудованный окуляром (увеличение 12×) с окулярной линейкой, цена деления которой составляла 1,60 мкм при использовании водоиммерсионного объектива 40× и 6,92 мкм при увеличении объектива 9×. Кроме того, размер клеток вычисляли по цифровым фотографиям с использованием программы ImageJ v.1.43d (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Измеряли не менее десяти клеток, сохраняя принцип случайности выбора.

Фотографии выполнены с помощью цифровых фотокамер Olympus C-5050, Canon PowerShot A95, Canon PowerShot A640. Электронные микрофотографии, сделанные с использованием подготовленного нами материала, были получены с помощью микроскопа Jeol JSM-6390 LA (Япония).

Результаты

Черноморская двушовная пеннатная диатомовая водоросль *C. scalaris* на субстрате располагается в виде одиночных подвижных клеток с характерными Н-образными хлоропластами (рис. 1А), иногда выстраивается в ряды и никогда не образует слизистых трубок, подобных тем, которые наблюдаются у представителей рода *Berkeleya* Greville [9]. Створки линейные, слегка ланцетные с медиальным расширением. Апикальные концы створки широко округлены или

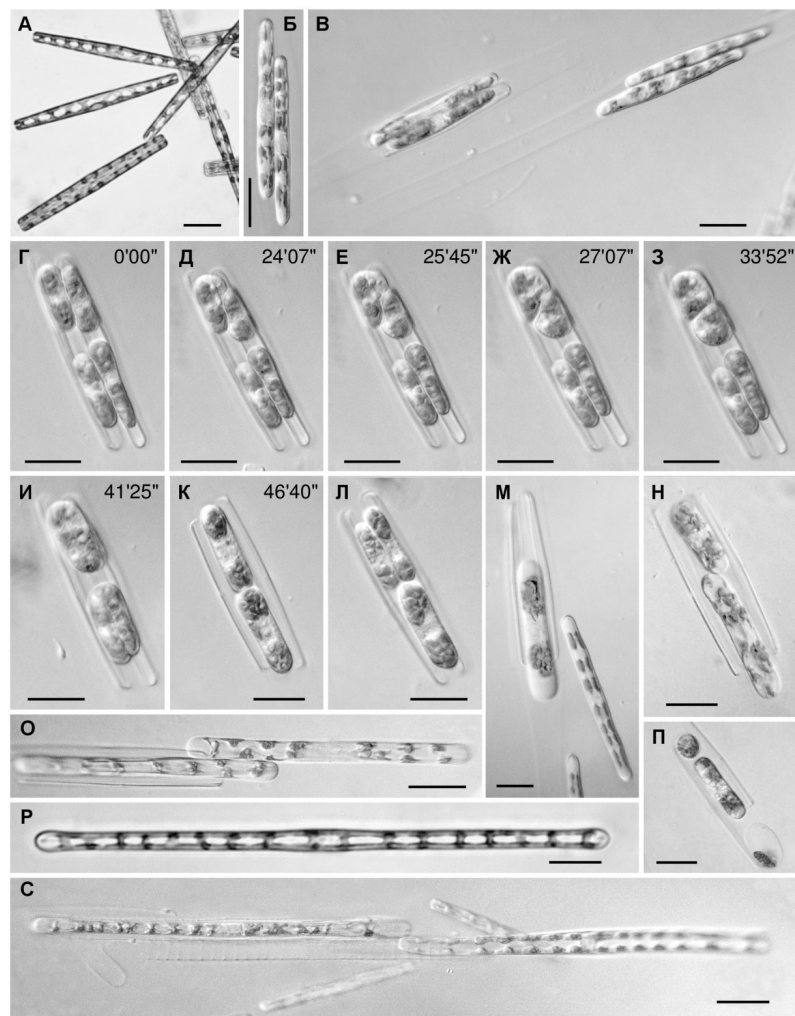


Рис. 1. Половой процесс и формирование аукоспор у *Climaconeis scalaris* (Brébisson) E.J. Сох. Клетки, в зависимости от их апикального размера, содержат от 3 до 18 характерных Н-образных хлоропластов (А). Репродуктивно совместимые клетки формируют гаметангиальную пару (Б). В парах клетки перемещаются друг относительно друга, образуя слизистую дорожку; хлоропласты концентрируются вблизи апикальных полюсов, клетки приступают к мейотическим делениям (В). В паре гаметангиальных клеток формируются четыре гаметы (Г), которые попарно сливаются (Д–И, время указано в минутах и секундах), образуя две зиготы (К). Иногда слияние одной пары гамет запаздывает (Л). Аукоспоры увеличиваются в размерах; хлоропласты в них распределяются вдоль апикальной оси, делятся, количество их удваивается (М–О). В некоторых случаях гаметы и зиготы abortируют (П). Инициальные клетки в два-три раза длиннее родительских, их размер близок к максимальному для вида, число хлоропластов в них всегда четное, вдвое большее этого показателя для родительских клеток, в постинициальных клетках оно начинает уменьшаться (Р). Инициальные клетки покидают перизониум, хорошо видимый в световой микроскоп (С). Световая микроскопия, светлое поле (А, Р), дифференциально-интерференционный контраст (остальные). Масштабная линейка 20 мкм.

слегка головчатые. Дистальные окончания шва заканчиваются перед концами створки. Трансапикальные штрихи параллельны по всей длине створки, порядка 20 штрихов в 10 мкм (рис. 2). При содержании водоросли в культуре клетки постепенно уменьшались в размерах. Отмечались случаи скачкообразного уменьшения. Размеры клеток измеряли в двенадцати клонах на протяжении от 2 до 42 мес. Всего было измерено 880 вегетативных

клеток и 395 инициальных клеток. Размеры клеток в культуре варьировали по длине от 29 до 229 мкм, по ширине — от 6,4 до 8,0 мкм. Клетки становились сексуально индуцируемыми после того, как их размер в длину достигал 114 мкм. Нижняя граница размерного диапазона клеток, пригодных для скрещивания, находилась в пределах от 30 до 42 мкм. Клоны, имевшие размеры клеток по длине 29 мкм, были неспособны к размножению половым путем. С уменьшением размеров клеток уменьшалось количество содержащихся в них хлоропластов, от 12–18 у инициальных клеток до 3–4 у самых мелких клеток в конце жизненного цикла (рис. 3).

Половое воспроизведение. У *C. scalaris* отмечено как гетероталлическое, так и гомоталлическое половое воспроизведение. Гетероталлизм легко определялся, если для скрещивания использовали клоны с различающимся размером клеток, и при этом во всех гаметангиальных парах наблюдались разноразмерные клетки.

Образование пар гаметангиальных клеток (родительские клетки, в которых впоследствии образуются гаметы) было первым видимым признаком вступления в половой процесс (рис. 1Б). Подвижность половых партнеров позволяла им встречаться в смешанных культурах даже с малой плотностью клеток. Во время взаимодействия гаметангиальные клетки активно скользили друг относительно друга. Выделяемая слизь формировала общую для каждой пары слизистую дорожку (рис. 1В), которой у вегетативных клеток не наблюдали. На 3–4-е сут после посева

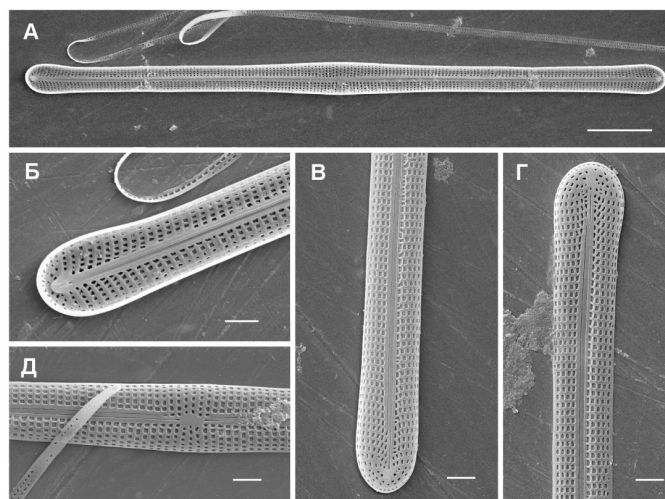


Рис. 2. Микроструктура панциря *Climaconeis scalaris* (Brébisson) E.J. Сох. Створка (вид изнутри) и поясковые ободки (А). Апикальные концы клетки, вид изнутри (Б) и снаружи (В, Г). Центральная часть створки, вид снаружи (Д). Сканирующая электронная микроскопия. Масштабная линейка 10 (А) и 2 (Б–Д) мкм.

в смесях репродуктивно совместимых клонов начинался гаметогенез, и можно было наблюдать гаметы. Каждая гаметангиальная клетка в паре продуцировала две гаметы — вытянутые, с закругленными концами (рис. 1Г). В процессе подготовки к делению хлоропласты группировались, перетекая к апикальным концам клетки. Деление протопласта происходило в трансапикальной плоскости. Перегруппировка гамет отсутствовала, они располагались друг за другом вдоль

апикальной оси. Гаметы были изогамными не только морфологически, но и поведенчески. Их слияние происходило в пространстве между тесно прижатыми друг к другу, параллельно расположенными створками двух гаметангиальных клеток. Процесс сингамии относительно быстротечен, от момента, когда может быть зафиксировано движение гамет, до их слияния проходит не более 20 мин (рис. 1Д–И). Перед слиянием гаметы могли иногда слегка укорачиваться, но это не было обязательным условием. Гаметы сливались попарно, что приводило к появлению двух зигот (рис. 1К). Сингамия не всегда бывает синхронной, наблюдались случаи, когда одна пара гамет уже слилась, образовав зиготу, а слияние второй задерживалось (рис. 1Л). Некоторые гаметы вообще не сливались, иногда происходило абортирование зигот, в результате в паре гаметангиев могла сформироваться единичная ауксоспора (рис. 1М). Ауксоспоры удлинялись вдоль апикальной оси (рис. 1Н, О). Неслившиеся гаметы и абортированные зиготы, погибая, раздувались и приобретали форму шара, в котором хлоропласты группировались в одном месте у стенки (рис. 1П). Молодые ауксоспоры находились между гаметангиальными створками и по форме мало отличались от гамет и зигот. Растущие ауксоспоры располагались параллельно створкам родительских клеток. В процессе роста ауксоспор происходило деление хлоропластов, таким образом их количество удваивалось по отношению к суммарному количеству, полученному от гамет (рис. 1Р). Иници-

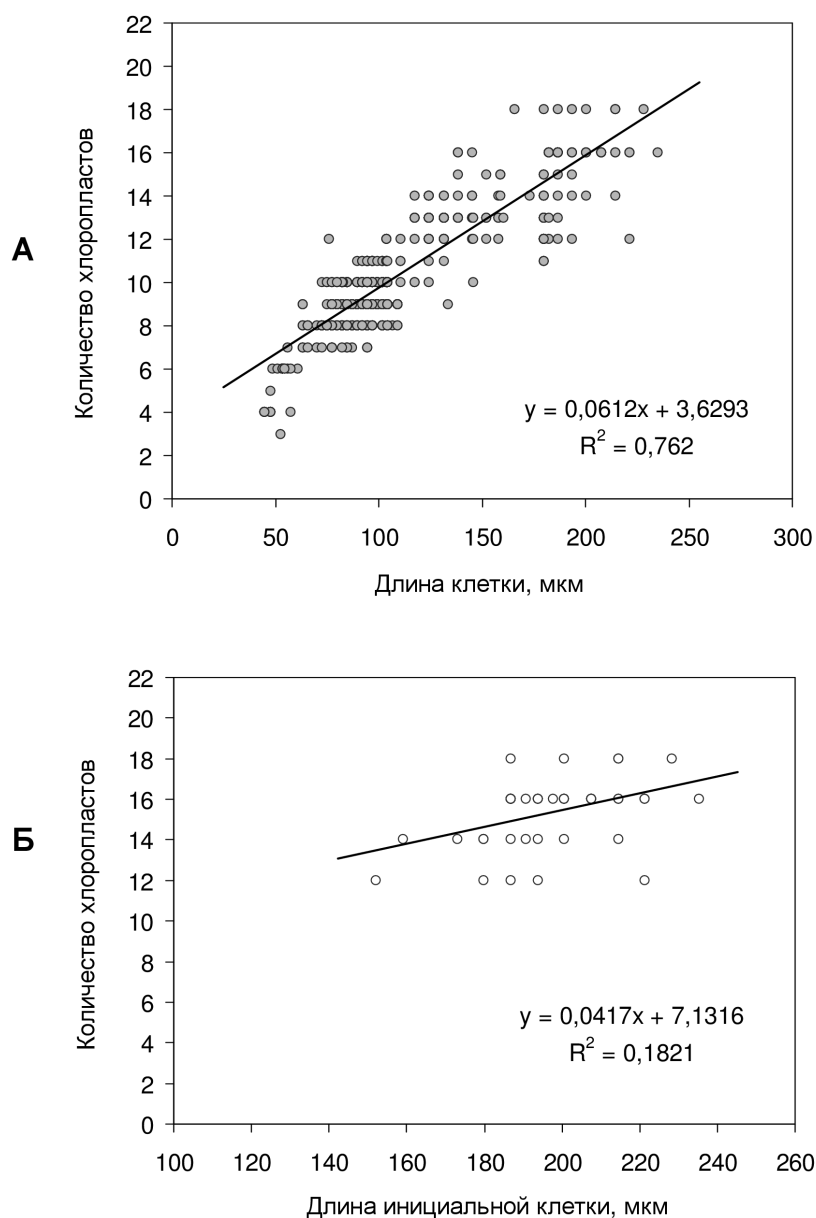


Рис. 3. Зависимость количества хлоропластов от длины клеток в целом (А) и от длины инициальных клеток (Б) у *Climaconeis scalaris*. Аппроксимация выполнена прямыми, для которых указаны уравнения и квадраты коэффициентов корреляции.

альные клетки высвобождались из перизониума путем активного скольжения. Перизониум хорошо развит, с заметными в световом микроскопе поперечными полосами (рис. 1С).

Внутриклоновое воспроизведение у *C. scalaris* было редким явлением и наблюдалось только в двух клонах. В моноклоновой культуре 5.0716-В воспроизведение отмечено только один раз. Внутриклоновое воспроизведение клона 5.0720-Z было отмечено в смесях этого клона с тихоокеанскими клонами 5.0630-F и 5.0630-D, выделенными из проб, взятых у побережья Новой Зеландии. Черноморский клон имел меньший размер клеток, и поскольку в процессе

полового воспроизведения в смешанных посевах участвовали исключительно клетки меньшего размера, сделано заключение о происходящем гомоталлическом воспроизведении. При этом клон 5.0720-Z в моноклоновой культуре, находившейся тех же условиях, не воспроизводился. Вероятнее всего, стимулом к внутриклоновому воспроизведению клона 5.0720-Z было присутствие в смесях тихоокеанских клонов. Остальные исследованные нами клоны демонстрировали исключительно гетероталлический способ воспроизведения.

Обсуждение

Диатомовые водоросли основную часть жизненного цикла находятся в диплоидном состоянии, гаплоидны только гаметы. У большинства диатомовых половое воспроизведение является облигатной стадией жизненного цикла [9, 10]. Изучение систем скрещивания показало, что у пennisных диатомей преобладает гетероталлическое половое воспроизведение [11, 12], в котором предполагается участие двух клонов. У некоторых видов диатомовых процесс воспроизведения может сопровождаться поведенческими, а иногда и морфологическими различиями между гаметами, продуцируемыми клонами различных типов спаривания, как, например, у *Tabularia tabulata* (C.A. Agardh) Snoeijs, *T. fasciculata* (C.A. Agardh) D.M. Williams [13], *Nitzschia longissima* (Brébisson) Ralfs [14]. У этих видов клетки одного

клона производят только активные «мужские» гаметы, тогда как клетки другого, репродуктивно совместимого клона производят исключительно пассивные «женские» гаметы — так называемая цис-анизогамия. В этом случае можно вести речь не о типах спаривания, а о проявлении пола. Анизогамия может наблюдаться и у тех видов, у которых в гаметангии формируется по одной гамете, например, у двушовных диатомовых рода *Sellaphora* Mereschkovsky [15] или моношовных — отдельных представителей рода *Cocconeis* Ehrenberg [16]. У ряда видов в гаметангиальной клетке формируется по две гаметы, но одна из них является активной, а другая — пассивной, в таком случае говорят о

транс-анизогамии, как, например, у *Schizostauron* Grunow [17].

У *C. scalaris* различий в морфологии и поведении гамет, образующихся в спарившихся гаметангиях, не наблюдалось. Гаметы морфологически и поведенчески были строго изогамными. Схема процесса полового воспроизведения *C. scalaris* соответствует типу IB2a по классификации Гайтлера [18]. Каждая из пары гаметангиальных клеток производила по две функциональные гаметы, результатом их слияния было образование двух зигот (рис. 1К). Апикальные оси гаметангиальных клеток и ауксоспор были параллельными, это хорошо прослеживалось на ранних этапах биполярного расширения ауксоспор (рис. 1Н, О). Параллельному расположению, очевидно, способствовала слизь, которая выделялась на этапах формирования гаметангиальных пар, что позволяло клеткам удерживаться на близком расстоянии. Слизистая капсула, которая предохраняет гаметы от воздействия извне, позволяет осуществить их тесную физическую близость и, тем самым, увеличивает вероятность сингамии, у *C. scalaris* отсутствовала, хотя у представителей более двадцати родов шовных диатомовых, включая *Craticula* Grunow, *Lyrella* Karajeva, *Placoneis* Mereschowsky и других, она представлена [20–21].

Морфологическая и поведенческая изогамия довольно широко распространена среды шовных пеннатных диатомовых. По нашим и литературным данным она имеет место у представителей как минимум пятнадцати родов, включая шовных и бесшовных; анизогамное воспроизведение описано у одиннадцати родов. По такой же схеме, как у *C. scalaris* (IB2a), половое воспроизведение протекает у представителей шести родов диатомовых (все они относятся к двушовным пеннатным). Филогенетически наиболее близкими к *Climaconeis* являются роды *Amphipleura* Kützing, *Berkeleya* и *Frustulia* Rabenhorst [22]. Половое воспроизведение, наблюдавшееся у *Berkeleya micans* (Lyngbye) Grunow, соответствует типу IB2a [9], в то время как у *Amphipleura pellucida* (Kützing) Kützing и *Frustulia rhomboides* var. *saxonica* (Rabenhorst) De Toni было существенно иным — отмечена транс-анизогамия типа IA1aβ, сопровождавшаяся формированием копуляционных каналов [23]. Схема полового воспроизведения в эволюционном плане является консервативной — будучи неизменной, она сохраняет единство вида, обеспечивая передачу генетической информации из поколения в поколение. Модификация ее важнейших характеристик свидетельствует о существенном эволюционном расхождении, что мы и наблюдаем в

эволюционной ветви, идущей от *Climaconeis* к *Amphipleura* и *Frustulia*.

Формирование копуляционных каналов характерно для представителей таких родов, как *Eunotia* Ehrenberg, *Neidium* Pfitzer, *Nitzschia* Hassall. Эволюционная дистанция, пройденная этими родами от момента разделения с предковыми формами до настоящего времени, составляет, согласно последним филогенетическим построениям, основанным на молекулярных данных и калиброванным по времени появления-исчезновения ископаемых диатомовых [22], порядка 30, 55 и 70 млн лет соответственно. Согласно этим же данным, род *Berkeleya* существует немногим более 75 млн лет, *Climaconeis* выделился в самостоятельный род около 70 млн лет тому назад, а чуть позже, около 55 млн лет тому назад, появились *Amphipleura* и *Frustulia*. Возникновение у последних копуляционных каналов и сопряженной с этим транс-анизогамии может рассматриваться в этой связи как эволюционный прогресс и, в то же время, как более узкая специализация.

Причина абортирования гамет и зигот, наблюдавшаяся у *C. scalaris*, не совсем ясна и требует дальнейшего изучения. Известно, что инбридинг и размер родительских клеток может влиять на число ауксоспор, создаваемых гаметангиальной парой. В отношении *C. scalaris* можно заметить, что все клоны были получены из природной популяции, выделены случайным образом, и размер клеток составлял 50–60% от максимального видового размера, т.е. они находились в начале генеративной фазы [24], и, следовательно, не было оснований для депрессивных явлений.

Н-образные хлоропласты встречаются у представителей многих родов, в частности, *Amphora* Ehrenberg ex Kützing, *Biremis* D.G. Mann & E.J. Cox, *Didymosphenia* M. Schmidt, *Gomphonema* Ehrenberg, *Hantzschia* Grunow. Виды *Climaconeis* всегда могут быть отделены по этому признаку от представителей ближайшего родственного рода *Berkeleya*, имеющих в клетке всего лишь два пластинчатых хлоропласта [5]. Для разграничения видов *Climaconeis* Рейд и Уильямс [5] использовали такую характеристику, как количество хлоропластов в клетке. Однако следует заметить, что ввиду описанной выше корреляции между длиной клеток и числом хлоропластов, этот признак следует использовать с осторожностью, тем более, что для многих видов диатомовых отсутствуют данные о диапазонах размеров, отвечающих полному жизненному циклу, и соответственно о возможном количестве хлоропластов в клетке.

Количество хлоропластов в инициальных клетках — ввиду удвоения в растущей ауксоспоре — может быть только четным числом (если при этом отсутствовали нарушения в ходе их деления). По мере уменьшения клеток в процессе повторяющихся митотических делений количество содержащихся в них хлоропластов со временем убывает, и как показывают наблюдения, их число может быть как четным, так и нечетным. Вышеописанная закономерность позволяет предположить существование механизма регуляции количества хлоропластов в клетке, связанного с уменьшением ее апикального размера в жизненном цикле. При этом для инициальных клеток достоверной корреляции между размерами и числом хлоропластов не было обнаружено (см. рис. 3Б).

Итак, половой процесс у двушовой пеннатовой диатомовой водоросли *C. scalaris* — ал-

логамный, включает как гетероталлическое, так и гомоталлическое половое воспроизведение, и соответствует типу IB2a по классификации Гайтлера. В жизненном цикле с уменьшением размеров клеток уменьшается и количество находящихся в них хлоропластов.

Исследования выполнены в рамках государственного задания по теме «Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов», № госрегистрации АААА-А19-119012490045-0.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lobban C.S. *Climaconeis desportesiae* and *C. leandrei* (Bacillariophyta, Berkeleyaceae), two new curved species from Guam, Western Pacific // Cryptogamie Algal. 2018. Vol. 39. N 3. P. 349–364.
2. Cox E.J. Studies on the diatom genus *Navicula* Bory. *Navicula copulorum* Bréb. and a further comment on the genus *Berkeleya* Grev. // Brit. Phycol. J. 1979. Vol. 14. N 2. P. 161–174.
3. Cox E.J. Taxonomic studies on the diatom genus *Navicula*: *Climaconeis*, a genus including *Okedenia inflexa* and members of the *Navicula* section *Johnsoniae* // Brit. Phycol. J. 1982. Vol. 17. N 2. P. 147–168.
4. Prasad A.K.S.K., Riddle K.A., Nienow J.A. Marine diatom genus *Climaconeis* (Berkeleyaceae, Bacillariophyta): two new species, *C. koenigii* and *C. colemaniae* from Florida Bay, USA // Phycologia. 2000. Vol. 39. N 3. P. 199–211.
5. Lobban C.S., Scheffter M., Jordan R.W., Arai Y., Sasaki A., Theriot E.C., Ashworth M., Ruck E.C., Pennisi C. Coral-reef diatoms (Bacillariophyceae) from Guam: new records and preliminary checklist, with emphasis on epiphytic species from farmer-fish territories // Micronesica. 2012. Vol. 43. N 1. P. 237–479.
6. Reid G., Williams D.M. The marine diatom genus *Climaconeis* (Berkeleyaceae, Bacillariophyta): Two new species from Abu Dhabi, United Arab Emirates // Diatom Res. 2002. Vol. 17. N 2. P. 309–318.
7. Lobban C.S., Jordan R.W. Diatoms on coral reefs and in tropical marine lakes // The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences / Eds. J.P. Smol and E.F. Stoermer. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2010. P. 346–356.
8. Давидович Н.А., Давидович О.И. Использование среды ESAW в опытах по изучению полового воспроизведения диатомовых водорослей // Сборник трудов, посвященный 95-летию Карадагской научной станции и 30-летию Карадагского природного заповедника Национальной академии наук Украины / Под ред. А.В. Гаевской и А.Л. Морозовой. Севастополь: ЭКО-СИ-Гидрофизика, 2009. С. 538–544.
9. Davidovich N.A. Sexual reproduction of *Berkeleya micans* (Lyngb.) Grun. (Bacillariophyta) // Int. J. Algae. 2001. Vol. 3. N 3. P. 1–12.
10. Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. The Diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1990. 747 pp.
11. Chepurinov V.A., Mann D.G., Sabbe K., Vyverman W. Experimental studies on sexual reproduction in diatoms // International review of cytology: A survey of cell biology, vol. 237 / Ed. K.W. Jeon. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. P. 91–154.
12. Рошчин А.М. Жизненные циклы диатомовых водорослей. К.: Наук. думка, 1994. 171 с.
13. Davidovich N.A., Davidovich O.I. Sexual reproduction and mating system of the diatom *Tabularia tabulata* (C. Agardh) Snoeijs (Bacillariophyta) // Int. J. Algae. 2011. Vol. 13. N 1. P. 18–36.
14. Davidovich N.A. Sex inheritance during

- intraclonal reproduction in the obligatory dioecious species *Nitzschia longissima* (Bréb.) Ralfs (Bacillariophyta) // Int. J. Algae. 2005. Vol. 7. N 2. P. 136–149.
15. Mann D.G. The diatom genus *Sellaphora*: separation from *Navicula* // Brit. Phycol. J. 1989. Vol. 24. N 1. P. 1–20.
16. Mizuno M., Okuda K. Seasonal change in the distribution of cell size of *Cocconeis scutellum* var. *ornata* (Bacillariophyceae) in relation to growth and sexual reproduction // J. Phycol. 1985. Vol. 21. N 4. P. 547–553.
17. Davidovich N.A., Davidovich O.I., Witkowski A., Li C., Dqbek P., Mann D.G., Zgłobicka I., Kurzydowski K.J., Gusev E., Górecka E., Krzywda M. Sexual reproduction in *Schizostauron* (Bacillariophyta) and a preliminary phylogeny of the genus // Phycologia. 2017. Vol. 56. N 1. P. 77–93.
18. Geitler L. Auxosporenbildung und Systematik bei pennaten Diatomeen und die Cytologie von *Cocconeis*-Sippen // Österr. Bot. Z. 1973. Vol. 122. N 5. P. 299–321.
19. Mann D.G., Stickle A.J. The genus *Craticula* // Diatom Res. 1991. Vol. 6. N 1. P. 79–107.
20. Mann D.G., Stickle A.J. Life history and systematics of *Lyrella* // Nova Hedwigia. 1993. Vol. 106. P. 43–70.
21. Mann D.G., Stickle A.J. Sexual reproduction and systematics of *Placoneis* (Bacillariophyta) // Phycologia. 1995. Vol. 34. N 1. P. 74–86.
22. Nakov T., Beaulieu J.M., Alverson A.J. Accelerated diversification is related to life history and locomotion in a hyperdiverse lineage of microbial eukaryotes // New Phytol. 2018. Vol. 219. N 1. P. 462–473.
23. Geitler L. Untersuchungen über Kopulation und Auxosporenbildung pennaten Diatomeen : II. Wander- und Ruhegameten bei *Amphipleura pellucida* // Österr. Bot. Z. 1952. Vol. 99. N 2–3. P. 385–395.
24. Davidovich N.A. Species-specific sizes and size range of sexual reproduction in diatoms // Proceedings of the 16th International Diatom Symposium (Athens & Aegean Islands, 25 August – 1 September 2000) / Eds. A. Economou-Amilli. Athens: University of Athens, 2001. P. 191–196.

Поступила в редакцию 26.07.2019 г.

После доработки 04.09.2019 г.

Принята в печать 17.09.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

SEXUAL REPRODUCTION OF THE BLACK SEA DIATOM *CLIMACONEIS SCALARIS* (BRÉBISSON) E.J. COX

O.I. Davidovich^{1,*}, N.A. Davidovich^{1,2}, R. Gastineau², A. Witkowski²

¹T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – natural reserve of the Russian Academy of Sciences, Branch of the A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Science str. 24, Kurortnoe, Feodosia, 298188, Russia;

²Institute of Marine and Environmental Sciences, University of Szczecin, Mickiewicza 16a, Szczecin, 70-383, Poland

*e-mail: olivdav@mail.ru

In laboratory conditions, the process of sexual reproduction of the Black Sea diatom *Climaconeis scalaris* (Brébisson) E.J. Cox, 1982 was initiated and studied. A crossing system of this species allows both homo- and heterotallic reproduction. The sexual process is allogamous. During active gliding of diploid mother gametangial cells relative to each other, mucilage was excreted, forming a mucilage track. Each gametangium in a pair produced two elongated cylindrical with rounded ends haploid gametes, which were largely morphologically and behaviorally isogamous. The division of the protoplast of the gametangial cell occurred in the transapical plane without rearrangement of gametes. Growing auxospores were located parallel to the parent frustules. Data on changes in the cell size, number of chloroplasts, as well as the position of cardinal points in the life cycle of the investigated species were obtained.

Keywords: diatoms, *Climaconeis scalaris*, clonal cultures, vegetative growth, sexual reproduction, auxosporulation

Сведения об авторах

Давидович Ольга Ивановна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории водорослей и микробиоты Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского — природный заповедник РАН — филиал ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН». Тел.: 8-365-622-62-12; e-mail: olivdav@mail.ru

Давидович Николай Александрович — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории водорослей и микробиоты Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского — природный заповедник РАН — филиал ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН». Тел.: 8-365-622-62-12; e-mail: karadag-algae@yandex.ru

Гастиньо Роман (Gastineau Romain) — Ph.D., науч. сотр. научно-образовательного центра естественных наук и отдела палеоокеанологии, факультет геологических наук Щецинского университета (Institute of Marine and Environmental Sciences, University of Szczecin, Szczecin, Poland). Тел.: +48-91-444-1000; e-mail: gastineauromain@yahoo.fr

Витковски Анджей (Witkowski Andrzej) — профессор, зав. палеоокеанологическим отделением факультета геологических наук Щецинского университета (Institute of Marine and Environmental Sciences, University of Szczecin, Szczecin, Poland). Тел.: +48-91-444-1000; e-mail: witkowsk@univ.szczecin.pl

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 593.11

ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ О РАКОВИННЫХ АМЕБАХ РЕКИ КОКО
ПРОВИНЦИЙ КУАНГНАМ И ДАНАНГ, ВЬЕТНАМ

К.Х. Чан

Совместный Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический
центр, Вьетнам, Ханой, Кау Зай, Нгуа До, Нгуен Ван Хуен 63
e-mail: hoantran2985@gmail.com

В работе представлены первые данные о видовом разнообразии раковинных амёб реки Коко провинций Куангнам и Дананг (Вьетнам). В 28 собранных пробах выявлено 55 видов и подвидов раковинных амёб, относящихся к 9 родам и 6 семействам. Видовое разнообразие раковинных амёб в планктоне выше, чем в донных пробах. Наибольшей частотой встречаемости характеризовались *Centropyxis aculeata* (64,3%), *Netzelia wailesi* (39,3%), *Diffugia acuminata* (32,1%), *Arcella discoides scutelliformis* (28,6%) и *Lesquereusia modesta* (28,6%). Наибольшим числом видов представлены роды *Diffugia* (25), *Arcella* (12), *Centropyxis* (5) и *Netzelia* (4). Кривая видового накопления, основанная на полученных данных, не насыщена и описывается уравнением $y = 12,56N^{0,46}$. Среднее видовое богатство раковинных амёб на пробу в планктоне ($13,0 \pm 3,1$) статистически выше, чем в донных пробах ($1,8 \pm 1,5$) ($p < 0,001$). Результат ординации (анализ избыточности) показывает, что исследованные гидрохимические показатели (температура, pH, содержание растворенного кислорода, электрическая проводимость, солёность) воды объясняют лишь 31,6% вариации видового состава раковинных амёб, в том числе первая и вторая оси объясняют 11 и 10,2% вариации соответственно.

Ключевые слова: раковинные амёбы, видовое разнообразие, река Коко, Куангнам, Дананг, анализ избыточности

Раковинные амёбы являются полифилетической группой простейших с широким распространением в природе. Они играют важную роль в экосистемах, поскольку являются компонентом «микробной петли» [1, 2]. Раковинные амёбы имеют практическое значение как биологические и палеоэкологические индикаторы [3–5] и даже используются в судебной экспертизе [6–8].

Большинство исследований раковинных амёб было проведено в Европе и Америке. В Азии количество исследований видового состава и распределения раковинных амёб крайне незначительно. К настоящему времени существует лишь несколько работ о разнообразии раковинных амёб Вьетнама [9–14]. При этом исследованиями охвачены лишь немногие районы.

Коко является небольшой, но исторически, экономически и культурно важной рекой для провинций Куангнам и Дананг, через которые она протекает. Её длина составляет примерно 28 км, и в истории она явилась важным водным путём, соединяющим порт Хойан (провинция

Куангнам) и порт Дананг (провинция Дананг). С экологической точки зрения река Коко интересна тем, что она течёт параллельно побережью Восточного моря и имеет два эстуарных выхода. Эти особенности гидрологии реки Коко влияют на условия обитания гидробионтов. При этом со временем процесс осадконакопления приводит к сужению реки, что сопровождается изменениями её экологического состояния и экономического значения. Всё это не получает должного внимания учёных. До настоящего момента отсутствуют работы о сообществе раковинных амёб реки Коко.

По утвержденному плану администраций обеих провинций Куангнам и Дананг, в ближайшее время будет проведено углубление и расширение русла реки Коко с целью экономического развития региона. Появляются проекты строительства недвижимости вдоль берега реки. Будущий эффект такого антропогенного влияния на эту реку с экологической точки зрения ещё остаётся неясным. В такой ситуации изучение

разнообразия тестаций реки Кок в настоящее время может дать полезную информацию для мониторинга состояния этой реки в будущем.

Материалы и методы исследования

Двадцать восемь планктонных и донных проб из четырнадцати точек на реке Кок были собраны в апреле 2017 г. (рис. 1). Точки 1–5 на-

пробы объёмом 1 мл были проанализированы с использованием микроскопа «Olympus CX43» с камерой «DP21» под увеличением 40–1000× для определения видового состава сообществ рако-винных амёб. Для видовой идентификации использовались общепринятые определители [15–17].

Для сравнения среднего видового богатства

тестаций в пробах планктона и бентоса использовали критерий Уилкоксона–Манна–Уитни (уровень статистической значимости $p=0,05$). Ординация методом анализа избыточности (Redundancy Analysis – RDA) использовалась для изучения связи между сообществами рако-винных амёб реки Кок и некоторыми показателями речной воды (рН, растворенный кислород, температура, электропроводность). Для этого анализа были использованы только данные планктонных проб.

Кривая видового накопления была построена по формуле:

$$y = aN^z$$

где: y – число видов; a – альфа-разнообразие; N – число проб; z – бета-разнообразие.

Данные обрабатывались с помощью языка программирования R версии 3.5.0.

Результаты и обсуждение

Вода реки Кок ближе к нейтральной с колебаниями рН от 6,6 до 8,8 (табл. 1). Наблюдается сильное изменение содержания растворённого кислорода от низких значений в биотопах с густыми зарослями водных растений до высоких показате-

лей, где поверхность воды более открыта. Электрическая проводимость воды реки Кок выше по сравнению с этим показателем для других внутренних водоёмов [18], но сходна со значениями для приморских водоёмов [14, 18].

В 28 собранных пробах было идентифицировано 55 видов и подвидов рако-винных амёб, относящихся к 9 родам и 6 семействам (табл. 2). Семь таксонов определены до уровня рода. 53 вида и подвида были найдены в планктонных пробах, тогда как только 15 видов обнаружено в донных пробах. Таким образом, для реки Кок видовое разнообразие рако-винных амёб в планктоне выше, чем в бентосе. В данной работе не были обнаружены новые виды для фауны рако-винных амёб Вьетнама.

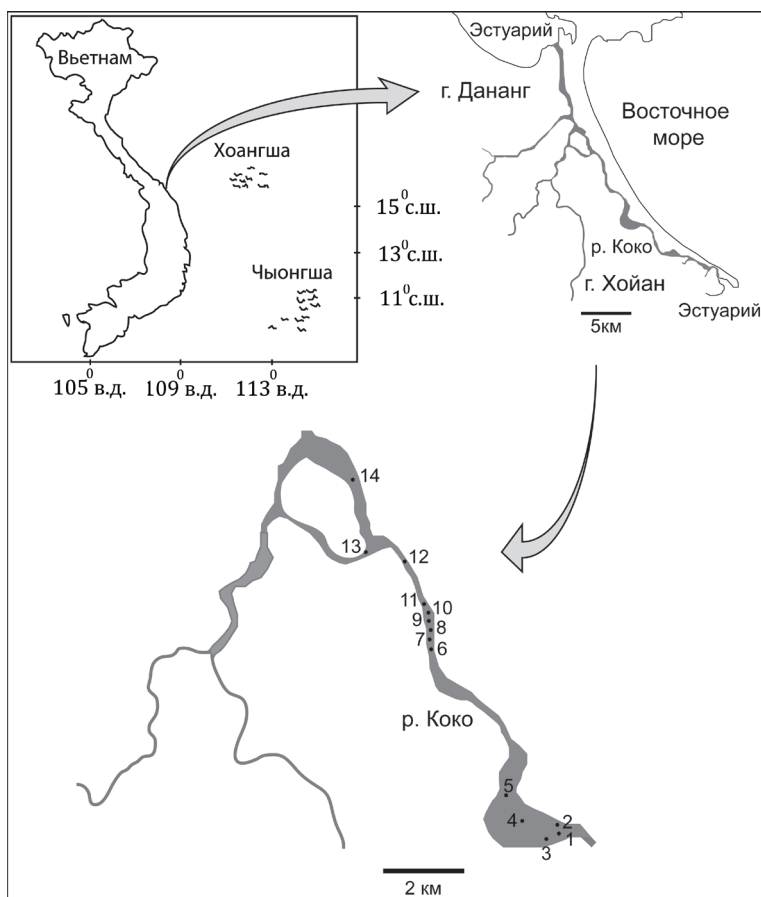


Рис. 1. Карта точек сбора проб.

ходятся на территории провинции Куангнам, а точки 6–14 – на территории провинции Дананг. Планктонные пробы были собраны из зарослей водных растений (водного гиацинта и водной осоки) планктонной сеткой с размером ячеек около 25 мкм. Донные пробы были собраны с помощью дночерпателя ДАК-100 и фиксированы формалином (4%).

Координаты точек сбора проб (табл. 1) были определены с помощью GPS-навигатора «Garmin GPSMAP 78sc». Гидрохимические параметры (температура, рН, содержание растворенного кислорода, электрическая проводимость, солёность) воды в местах сбора проб были измерены прибором «Hanna HI 9828».

От семи до десяти повторностей каждой

Таблица 1

Координаты точек сбора проб и некоторые физико-химические параметры воды

Точки	Координаты	Температура (°С)	pH	Содержание растворенного кислорода (мг/л)	Электрическая проводимость (мкСм/см)	Соленость (‰)
1	15° 55,927' с.ш. 108° 17,805' в.д.	26,41	7,12	1,26	375	0,18
2	15° 55,938' с.ш. 108° 17,796' в.д.	25,48	7,05	1,01	477	0,23
3	15° 55,867' с.ш. 108° 17,716' в.д.	26,58	7,19	0,37	210	0,10
4	15° 56,076' с.ш. 108° 17,326' в.д.	27,26	6,65	0,47	228	0,11
5	15° 56,435' с.ш. 108° 17,110' в.д.	27,59	7,68	8,74	177	0,08
6	15° 58,626' с.ш. 108° 16,036' в.д.	27,58	7,64	0,95	490	0,23
7	15° 58,648' с.ш. 108° 16,047' в.д.	28,19	8,19	3,96	945	0,46
8	15° 58,670' с.ш. 108° 16,078' в.д.	27,59	7,70	3,48	450	0,21
9	15° 58,809' с.ш. 108° 16,042' в.д.	28,00	8,62	9,43	448	0,21
10	15° 58,808' с.ш. 108° 16,031' в.д.	27,46	7,58	0,79	380	0,18
11	15° 58,791' с.ш. 108° 16,047' в.д.	29,28	7,79	2,27	402	0,19
12	15° 59,528' с.ш. 108° 15,708' в.д.	28,78	7,94	4,94	459	0,22
13	15° 59,610' с.ш. 108° 15,134' в.д.	28,39	7,41	0,38	593	0,28
14	16° 00,623' с.ш. 108° 15,027' в.д.	29,08	8,84	9,29	1291	0,64

Наибольшей частотой встречаемости характеризуется *Centropyxis aculeata* (64,3% проб). При этом данный вид отмечен во всех планктонных пробах, но только в 28,6% донных проб. Среди других видов часто встречается *Netzelia walesi* (39,3%), *Diffugia acuminata* (32,1%), *Arcella discoides scutelliformis* (28,6%), *Lesquereusia modesta* (28,6%). Во Вьетнаме *Centropyxis aculeata* и *Lesquereusia modesta* также характеризовались высокой встречаемостью в других водоемах [10, 14].

Кривая накопления видового разнообразия раковинных амёб реки Коко описывается уравнением $y = 12,56N^{0,46}$. Данная кривая не насыщена, увеличение количества проб приведет к обнаружению но-

вых видов для изучаемого водоема. Альфа- и бета-разнообразие раковинных амёб реки Коко сходны с таковыми для озера Баушен (провинция Бинь-Тхуан, Вьетнам) [14]. Альфа-разнообразие раковинных амёб реки Коко выше, чем в озере Баучанг (провинция Бинь-Тхуан, Вьетнам), но ниже, чем в озере Баушау (провинция Донг-Най, Вьетнам). Напротив, бета-разнообразие раковинных амёб реки Коко ниже, чем в озере Баучанг, но выше, чем в озере Баушау [10, 14].

Наибольшим числом видов представлены роды *Diffugia* (25), *Arcella* (12), *Centropyxis* (5) и *Netzelia* (4). Высокое число видов данных родов также отмечено в других реках, таких как реки Курачай, Шамкирчай (Азербайджан), Влтава (Чехия) и

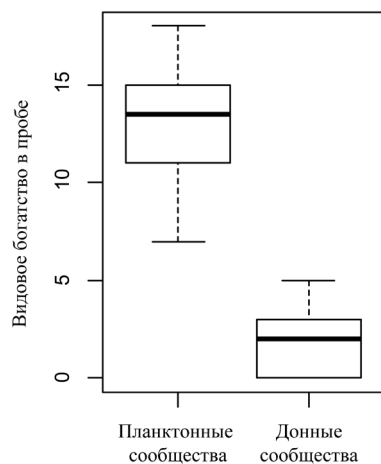


Рис. 2. Видовое богатство таксоценозов раковинных амёб в планктонных и бентосных пробах из реки Коко.

Таблица 2

Видовое богатство и встречаемость раковинных амёб в реке Кокко

№	Виды	Встречаемость (%)		
		Планктонные пробы	Донные пробы	Всего
СЕМЕЙСТВО ARCELLIDAE EHRENBERG, 1843				
Род <i>Arcella</i> Ehrenberg, 1830				
1	<i>Arcella conica</i> (Playfair, 1918) Deflandre, 1928	21,4	0	10,7
2	<i>Arcella discoides</i> Ehrenberg, 1843	50	0	25
3	<i>Arcella discoides scutelliformis</i> Playfair, 1918	57,1	0	28,6
4	<i>Arcella gibbosa</i> Penard, 1890	7,1	0	3,6
5	<i>Arcella hemishaerica</i> Perty, 1852	7,1	0	3,6
6	<i>Arcella intermedia</i> (Deflandre, 1928) Tsyganov, Mazei, 2006	28,6	0	14,3
7	<i>Arcella intermedia laevis</i> (Deflandre, 1928) Tsyganov, Mazei, 2006	28,6	0	14,3
8	<i>Arcella megastoma</i> Penard, 1902	14,3	7,1	10,7
9	<i>Arcella vulgaris</i> Ehrenberg, 1830	21,4	0	10,7
10	<i>Arcella</i> sp. 1	7,1	0	3,6
11	<i>Arcella</i> sp. 2	14,3	0	7,1
12	<i>Arcella</i> sp. 3	7,1	0	3,6
СЕМЕЙСТВО CENTROPYXIDAE JUNG, 1942				
Род <i>Centropyxis</i> Stein, 1857				
13	<i>Centropyxis aculeata</i> (Ehrenberg, 1832) Stein, 1857	100	28,6	64,3
14	<i>Centropyxis aerophila sphagnicola</i> Deflandre, 1929	21,4	28,6	25
15	<i>Centropyxis constricta</i> (Ehrenberg, 1841) Deflandre, 1929	21,4	21,4	21,4
16	<i>Centropyxis ecornis</i> (Ehrenberg, 1841) Leidy, 1879	14,3	0	7,1
17	<i>Centropyxis laevigata</i> Penard, 1890	35,7	0	17,9
Род <i>Cyclopyxis</i> Deflandre, 1929				
18	<i>Cyclopyxis eurystoma</i> Deflandre, 1929	7,1	0	3,6
19	<i>Cyclopyxis kahli</i> Deflandre, 1929	0	7,1	3,6
20	<i>Cyclopyxis plana</i> Bartos, 1963	7,1	0	3,6
СЕМЕЙСТВО DIFFLUGIIDAE WALLICH, 1864				
Род <i>Diffugia</i> Leclerc, 1815				
21	<i>Diffugia acuminata</i> Ehrenberg, 1838	50	14,3	32,1
22	<i>Diffugia ampullula</i> Playfair, 1918	7,1	0	3,6
23	<i>Diffugia brevicolla</i> Cash et Hopkinson, 1909	35,7	7,1	
24	<i>Diffugia capreolata</i> Penard, 1902	35,7	0	
25	<i>Diffugia curvicaulis</i> Penard, 1899	0	7,1	3,6
26	<i>Diffugia elegans</i> Penard, 1890	7,1	7,1	7,1
27	<i>Diffugia elegans angustata</i> Gauthier-Lievre et Thomas, 1958	35,7	0	17,9
28	<i>Diffugia gigantea</i> (Chardez, 1967) Ogden et Fairman, 1979	21,4	0	10,7
29	<i>Diffugia gramen</i> Penard, 1902	7,1	0	3,6
30	<i>Diffugia lanceolata</i> Penard, 1890	7,1	7,1	7,1
31	<i>Diffugia limnetica</i> Penard, 1902		0	7,1
32	<i>Diffugia linearis</i> (Penard, 1890) Gauthier-Lievre et Thomas, 1958	7,1	7,1	7,1

Продолжение

Таблица 2

№	Виды	Встречаемость (%)		
		Планктонные пробы	Донные пробы	Всего
33	<i>Diffugia lithophila</i> (Penard, 1902) Gauthier-Lievre et Thomas, 1958	21,4	0	10,7
34	<i>Diffugia lobostoma</i> Leidy, 1879	28,6	0	14,3
35	<i>Diffugia minuta</i> Rampi, 1950	7,1	0	3,6
36	<i>Diffugia oblonga</i> Ehrenberg, 1838	7,1	0	3,6
37	<i>Diffugia paulii</i> Ogden, 1983	7,1	7,1	7,1
38	<i>Diffugia schurmanni</i> van Oye, 1932	35,7	0	17,9
39	<i>Diffugia urceolata</i> Carter, 1864	7,1	0	3,6
40	<i>Diffugia urceolata sphaerica</i> Playfair, 1917	7,1	0	3,6
41	<i>Diffugia venusta</i> (Penard, 1902) Ogden, 1983	35,7	14,3	25
42	<i>Diffugia</i> sp. 1	28,6	0	14,3
43	<i>Diffugia</i> sp. 2	21,4	0	10,7
44	<i>Diffugia</i> sp. 3	14,3	0	7,1
45	<i>Diffugia</i> sp. 4	14,3	0	7,1
Род <i>Cucurbitella</i> Penard, 1902				
46	<i>Cucurbitella vlasinensis</i> Ogden et Zivkovic, 1983	7,1	0	3,6
СЕМЕЙСТВО LESQUEREUSIDAE OGDEN, 1979				
Род <i>Lesquereusia</i> Schlumberger, 1845				
47	<i>Lesquereusia modesta</i> Rhumbler, 1895	57,1	0	28,6
48	<i>Lesquereusia spiralis</i> (Ehrenberg, 1840) Butschli	14,3	0	7,1
Род <i>Netzelia</i> Ogden, 1979				
49	<i>Netzelia corona</i> (Wallich, 1864) Gomaa et al., 2017	42,9	7,1	25
50	<i>Netzelia oviformis</i> (Cash, 1909) Ogden, 1979	50	0	25
51	<i>Netzelia tuberculata</i> (Wallich, 1864) Netzel, 1983	14,3	0	7,1
52	<i>Netzelia wailesi</i> (Ogden, 1980) Meisterfeld, 1984	71,4	7,1	39,3
СЕМЕЙСТВО EUGLYPHIDAE WALLICH, 1864				
Род <i>Euglypha</i> Dujardin, 1841				
53	<i>Euglypha acanthophora</i> (Ehrenberg, 1841) Perty, 1849	42,9	0	21,4
54	<i>Euglypha rotunda</i> Wailes, 1915	42,9	0	21,4
СЕМЕЙСТВО TRINEMATIDAE HOOGENRAAD ET DE GROOT, 1940				
Род <i>Trinema</i> Dujardin, 1841				
55	<i>Trinema enchelys</i> (Ehrenberg, 1838) Leidy, 1878	21,4	0	10,7
Количество видов и подвидов		53	15	55

Сура (Россия) [19–21].

Диаграмма видового богатства (рис. 2) и результат теста Уилкоксона–Мана–Уитни показывают, что среднее видовое богатство раковинных амёб на пробу в планктоне ($13,0 \pm 3,1$) статистически выше, чем в бентосе ($1,8 \pm 1,5$) ($p < 0,001$). Данный результат отличается от результата исследований, проведенных на озере Гуарана (Бразилия), где среднее видовое богатство в пробе в донных сообществах выше, чем в планктонных [22]. К настоящему моменту трудно сделать однозначный вывод о различиях видового богат-

ства раковинных амёб в планктоне и бентосе ввиду малого количества исследований, посвященных данной проблематике.

Результат анализа избыточности показывает, что изучаемые показатели воды объясняют лишь 31,6% вариации видового состава раковинных амёб. При этом первая (RDA1) и вторая (RDA2) оси объясняют 11% и 10,2% вариации соответственно (рис. 3). Виды *Arcella* sp. 1, *Diffugia gramen* и *Cyclopyxis eurystoma* ассоциированы с точкой 5, которая характеризовалась высоким содержанием растворенного кислоро-

да и низкой электропроводностью. Напротив, виды *Lesquereusia spiralis* и *Arcella megastoma* ассоциированы с точкой 2 с низким содержанием растворенного кислорода. Распределение вида *Diffugia elegans* показывает высокую положительную корреляцию с содержанием растворенного кислорода, а распределение *Arcella megastoma* и *Lesquereusia spiralis* отрицательно коррелирует с величиной pH воды.

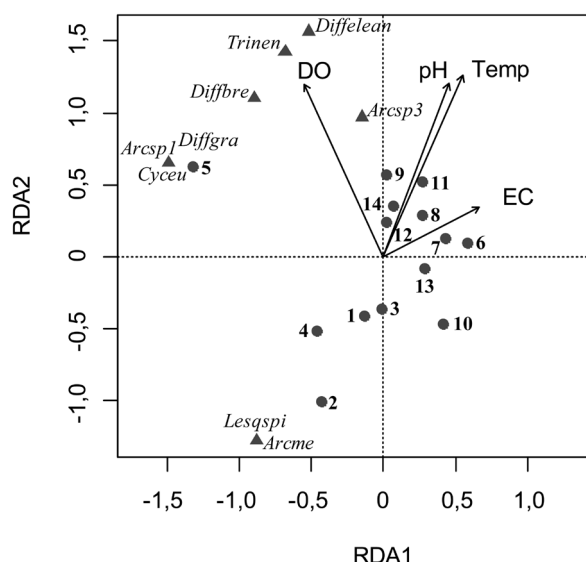


Рис. 3. Диаграмма анализа избыточности (Redundancy Analysis – RDA) сообществ раковинных амёб реки Коко. Треугольники – виды. На диаграмме показаны только те виды, распространение которых более чем на 50% объясняется изучаемыми показателями воды. Круги – точки сбора проб. Стрелки – изучаемые показатели воды (DO – растворенный кислород, Temp – температура, EC – электропроводность). RDA1 и RDA2 – первая и вторая оси, которые соответственно объясняют 11 % и 10,2 % вариации видового состава раковинных амёб. Arcme – *Arcella megastoma*, Arcsp1 – *Arcella* sp. 1, Arcsp3 – *Arcella* sp. 3, Cyceu – *Cyclopyxis eurystoma*, Diffbre – *Diffugia brevicolla*, Diffelean – *Diffugia elegans*, Diffgra – *Diffugia gramen*, Lesqspi – *Lesquereusia spiralis*, Trinen – *Trinema enchelys*.

Результаты других исследований также показывают, что *Diffugia gramen* адаптирована к биотопам с высоким содержанием растворенного кислорода [23], тогда как *Arcella megastoma* предпочитает местообитания с его низким содержанием [24]. Однако литературные данные [24], в отличие от результатов нашей работы, свиде-

тельствуют о положительной корреляции между распределением *Arcella megastoma* и *Lesquereusia spiralis* и pH воды. В настоящее время количество работ, посвященных изучению биологии и экологического распределения отдельных видов раковинных амёб, их связи с факторами среды, крайне ограничено, так что требуется проведение дальнейших исследований в этом направлении.

Таким образом, фауна раковинных амёб Вьетнама всё ещё мало изучена. Получены первые результаты изучения разнообразия раковинных амёб реки Коко. В 28 отобранных пробах идентифицировано 55 видов и подвидов раковинных амёб, относящихся к 9 родам и 6 семействам. Для реки Коко количество определенных видов раковинных амёб в планктоне заметно выше, чем в бентосе. *Centropyxis aculeata*, *Netzelia wailesi*, *Diffugia acuminata*, *Arcella discoides scutelliformis* и *Lesquereusia modesta* являются наиболее распространенными видами в изучаемой реке. Было показано, что родами с самыми высокими количествами видов являются *Diffugia* (25 видов), *Arcella* (12), *Centropyxis* (5) и *Netzelia* (4). Кривая накопления видов раковинных амёб реки Коко описывается уравнением $y = 12,56N^{0,46}$. Данная кривая не насыщена и увеличение количества проанализированных проб приведет к обнаружению новых видов для изучаемого водоема. Среднее видовое богатство раковинных амёб реки Коко в пробе планктона статистически выше, чем в донной пробе. Результат изучения связи между сообществами раковинных амёб и гидрохимическими показателями воды с использованием анализа избыточности показывает, что изучаемые абиотические параметры объясняют лишь 31,6% вариации разнообразия раковинных амёб.

Автор выражает благодарность к.б.н. Д.В. Тихоненкову за помощь и ценные советы при подготовке статьи. Данная работа профинансирована Совместным Российско-Вьетнамским Тропическим научно-исследовательским и технологическим центром (грант № 275/QĐ-CNVB).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gilbert D., Amblard C., Bourdier G., Francez A.J. The microbial loop at the surface of a peatland: structure, function, and impact of nutrient input // Microb. Ecol. 1998. Vol. 35. N 1. P. 83–93.
2. Mieczan T., Tarkowska-Kukuryk M. Diurnal dynamics of the microbial loop in peatlands: structure, function and relationship to environmental parameters // Hydrobiologia. 2013. Vol. 717. N 1.

P. 189–201.

3. *Payne R.J.* Seven reasons why protists make useful bioindicators // *Acta Protozool.* 2013. Vol. 52. N 3. P. 105–113.

4. *Marcisz K., Colombaroli D., Jassey V.E.J., Tinner W., P. Kołaczek P., Gałka M., Karpińska-Kołaczek M., Słowiński M., Lamentowicz M.* A novel testate amoebae trait-based approach to infer environmental disturbance in *Sphagnum* peatlands // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6: 33907. DOI: 10.1038/srep33907.

5. *Tsyganov A.N., Babeshko K.V., Novenko E.Yu., Malysheva E.A., Payne R.J., Mazei Yu.A.* Quantitative reconstruction of peatland hydrological regime with fossil testate amoebae communities // *Russ. J. Ecol.* 2017. Vol. 48. N 2. P. 191–198.

6. *Seppey C.V.W., Fournier B., Szelecz I., Singer D., Mitchell E.A.D., Lara E.* Response of forest soil euglyphid testate amoebae (Rhizaria: Cercozoa) to pig cadavers assessed by high-throughput sequencing // *Int. J. Legal Med.* 2016. Vol. 130. N 2. P. 551–562.

7. *Swindles G.T., Ruffell A.* A preliminary investigation into the use of testate amoebae for the discrimination of forensic soil samples // *Sci. Justice.* 2009. Vol. 49. N 3. P. 182–190.

8. *Szelecz I., Fournier B., Seppey C., Amendt J., Mitchell E.* Can soil testate amoebae be used for estimating the time since death? A field experiment in a deciduous forest // *Forensic Sci. Int.* 2013. Vol. 236. P. 90–98.

9. *Balik V.* Testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda) from a primary mountain rain forest in the Tam-Dao region (Vietnam) // *Acta Soc. Zool. Bohem.* 1995. Vol. 59. N 1. P. 1–16.

10. *Bobrov A.A., Mazei Y.A., Tiunov A.V.* Testate amoebae of a monsoon tropical forest of South Vietnam // *Acta Protozool.* 2010. Vol. 49. N 4. P. 311–325.

11. *Golemansky V.* Thécamoebiens psammobiontes du supralittoral vietnamien de la Mer Chinoise et description de *Cryptodiffugia brevicolla* sp. n. (Rhizopoda: Arcellinida) // *Acta Protozool.* 1979. Vol. 18. N 2. P. 285–292.

12. *Nguyen V.H., Bernard N., Mitchell E.A.D., Cortet J., Badot P.M., Gilbert D.* Relationship between testate amoeba (Protist) communities and atmospheric heavy metals accumulated in *Barbula indica* (Bryophyta) in Vietnam // *Microb. Ecol.* 2007. Vol. 53. N 1. P. 53–65.

13. *Shirota A.* The plankton of South Viet-Nam: Fresh water and marine plankton. Overseas Technical Cooperation Agency, 1966. 506 pp.

14. *Tran Q.H.* Diversity and community patterns of testate amoebae in Bau Sen and Bau Trang Lakes in Binh Thuan Province, Vietnam // *Inland Water Biol.* 2017. Vol. 10. N 1. P. 1–7.

15. *Kudo R.R.* Protozoology. Handbook of protozoology. Springfield; Baltimore: Charles C. Thomas Publ., 1939. 982 pp.

16. *Charman D.J., Hendonand D., Woodland W.A.* The identification of testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda) in peats. QRA Technical Guide No. 9. London: Quaternary Research Association, 2000. 147 pp.

17. *Мазей Ю.А., Цыганов А.Н.* Пресноводные раковинные амебы. Москва: Товарищество науч. изд. КМК, 2006. 304 с.

18. Экология внутренних вод Вьетнама / Под ред. Д.С. Павлова и Д.Д. Зворыкина. М.: Товарищество науч. изд. КМК, 2014. 432 с.

19. *Snegovaya N., Alekperov I.* Fauna of testate amoebae of western Azerbaijan rivers // *Protistology.* 2005. Vol. 4. N 2. P. 149–183.

20. *Holcova K.* Thecamoebians from the Upper Vltava river (Šumava mountains, Czech republic): species composition of assemblages vs. environment in streams // *J. Foramin. Res.* 2007. Vol. 37. N 4. P. 287–299.

21. *Мазей Ю.А., Цыганов А.Н.* Раковинные амебы в водных экосистемах поймы реки Суры (Среднее Поволжье). 1. Фауна и морфоэкологические особенности видов // *Зоол. журн.* 2006. Т. 85. № 11. С. 1267–1280.

22. *Alves G.M., Velho L.F.M., Simões N.R., Lansac-Tôha F.A.* Biodiversity of testate amoebae (Arcellinida and Euglyphida) in different habitats of a lake in the Upper Paraná River floodplain // *Eur. J. Protistol.* 2010. Vol. 46. N 4. P. 310–318.

23. *Farooqui A.* Fresh water thecamoebians: ecological indicators of seasonally induced hydrological changes in lakes // *Экол. ноосферол.* 2009. Т. 20. № 3–4. С. 117–123.

24. *Lamentowicz L., Gabka M., Rusinska A., Sobczynski T., Owsianny P.M., Lamentowicz M.* Testate amoeba (Arcellinida, Euglyphida) ecology along a poor-rich gradient in fens of Western Poland // *Int. Rev. Hydrobiol.* 2011. Vol. 96. N 4. P. 356–380.

Поступила в редакцию 06.07.2019 г.

После доработки 09.09.2019 г.

Принята в печать 17.09.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

THE FIRST DATA ON THE TESTATE AMOEBAE OF THE COCO RIVER IN THE PROVINCES OF QUANGNAM AND DANANG, VIETNAM

Q.H. Tran

*Joint Russian-Vietnamese Tropical Research and Technological Center, 63 Nguyen Van Huyen,
Nghia Do, Cau Giay, Ha Noi, Viet Nam
e-mail: hoantran2985@gmail.com*

First data on the species diversity of testate amoebae of the Coco River in the provinces of Quangnam and Danang (Vietnam) was presented. A total of 55 species and subspecies of testate amoebae belonging to 9 genera and 6 families were identified from 28 samples. Species diversity of testate amoebae of plankton was higher than the bottom samples. The highest frequency of occurrence being of *Centropyxis aculeata* (64.3%), *Netzelia walesi* (39.3%), *Diffugia acuminata* (32.1%), *Arcella discoides scutelliformis* (28.6%) and *Lesquereusia modesta* (28.6%). The most species-rich genera are *Diffugia* (25), *Arcella* (12), *Centropyxis* (5) and *Netzelia* (4). The species accumulation curve based on the entire dataset was unsaturated and described by the equation $y = 12.56N^{0.46}$. The average species richness of testate amoebae per sample in plankton (13.0 ± 3.1) is statistically higher than in the bottom samples (1.8 ± 1.5) ($p < 0.001$). The result of the redundancy analysis shows that the studied hydrochemical water characteristics (temperature, pH, dissolved oxygen, electrical conductivity and salinity) explained only 31.6% of the variation of testate amoeba diversity, wherein the first and second axes explained 11% and 10.2% of this variation, respectively.

Keywords: *Testate amoebae, species diversity, Coco River, Quangnam, Danang, the redundancy analysis*

Сведения об авторе

Чан Куок Хоан — канд. биол. наук, науч. сотр. Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра. Тел.: +8-439-864-62-67;
e-mail: hoantran2985@gmail.com

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 612.821.6+615.214+591.18

ВЛИЯНИЕ ДИАЗЕПАМА, ПИРАЦЕТАМА И МЕКСИДОЛА НА УСЛОВНЫЙ РЕФЛЕКС ПАССИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ

А.Н. Иноземцев^{1,*}, Д. С. Бережной^{1,2}, А.В. Новоселецкая¹

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

²*Лаборатория клинической и экспериментальной нейробиологии, Научный центр неврологии, Россия, 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 80*

**e-mail: a_inozemtsev@mail.ru*

В опытах на крысах сопоставлено влияние анксиолитика диазепама и ноотропов пирацетама и мексидола на условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) в трехкамерной установке, состоящей из центрального освещенного отсека, темного опасного отсека, в котором крыса получала удар током, и темного безопасного отсека, в котором она не подвергалась электрошолевому воздействию. Удар током при выработке УРПИ вызвал у контрольных животных резкое увеличение латентного периода ухода из центрального отсека при тестировании, но при этом не привёл к выбору безопасного отсека. На основе этих данных о различном воздействии удара на УРПИ было сформулировано предположение о том, что процессы обучения, которые обуславливают задержку двигательной реакции и выбор безопасного отсека, имеют различную ассоциативную природу. Увеличение латентного периода связано с классическим условнорефлекторным страхом безотносительно к месту воздействия удара током. Выбор безопасного отсека, напротив, связан с формированием следа памяти о местоположении электрокожного раздражения. Использование фармакологических веществ, по-разному влияющих на страх и память, дало дополнительные аргументы в пользу предположения о различных ассоциативных процессах, определяющих формирование УРПИ. Снижение уровня страха с помощью диазепама уменьшило латентный период двигательной реакции относительно контрольной величины, но не повлияло на выбор безопасного отсека. В отличие от этого, мнемотропные свойства пирацетама и мексидола увеличили предпочтение безопасного отсека без увеличения латентного периода. Эти дифференцированные фармакологические эффекты подтверждают, что УРПИ основан на формировании условной реакции страха, которая вызывает увеличение латентного периода ухода из центрального отсека, и памяти о месте электрошолевого воздействия, которая обеспечивает выбор безопасного отсека.

Ключевые слова: *модифицированное пассивное избегание, память, диазепам, пирацетам, мексидол, условнорефлекторный страх, выбор безопасного отсека*

Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) широко используется для изучения влияния на обучение и память различных факторов. В частности, методика в экспериментальной психофармакологии используется в качестве базисной модели для анализа вновь синтезированных ноотропных веществ, что обусловлено ее достоинствами, такими как быстрота обучения и возможность дифференцированного влияния на различные фазы памяти, неотягощенной последующим обучением. В основном используется камера из темного и освещенного отсеков, соединенных дверцей. Помещенное в освещен-

ный отсек животное в силу норкового рефлекса быстро переходит в темный отсек, где получает удар током. Это приводит к резкому увеличению латентного периода (ЛП) захода в него при последующем тестировании, что рассматривается как показатель обучения и памяти.

Работ, посвященных анализу природы следа памяти, формируемого при выработке УРПИ, остается критически мало, несмотря на важность этой проблемы. В основном исходят из постулата, согласно которому след памяти содержит характеристики места нанесения болевого раздражения и обеспечивает "предвосхищение опасных

последствий входа в него" [1]. Для анализа этого постулата было изучено формирование УРПИ в трехкамерной установке, состоящей из освещенного отсека, темного опасного отсека, в котором крыса получала удар током, и темного безопасного отсека, в котором она не подвергалась электрошоковому воздействию [2]. Предполагалось, что если постулат верен, то животные будут заходить в безопасный отсек.

Однако было установлено, что увеличение ЛП реакции не приводит к выбору безопасного отсека не только при однократном, но даже и при трехкратном обучении (ударах током в опасном отсеке при заходе в него в последовательных тестированиях). На этом основании было высказано предположение, что процессы обучения, которые вызывают увеличение ЛП и выбор безопасного отсека, имеют различную ассоциативную природу. Увеличение времени пребывания в центральном отсеке обусловлено неспецифической оборонительной реакцией замирания, не соотносящейся с местом удара током. Выбор безопасного отсека связан с необходимостью запоминания места нанесения тока и выработкой пространственной дифференцировки между ним и опасным отсеком. На наш взгляд, анализу роли этих ассоциативных процессов может способствовать изучение эффектов нейротропных веществ, избирательно влияющих на обучение и память или страх.

Современная экспериментальная психофармакология располагает такими средствами. Препаратами, влияющими на обучение и память, служат ноотропы, обладающие широким спектром фармакологических эффектов [3]; к ним относятся, в частности, пираретам и мексидол. Препаратами, влияющими на страх и тревогу, служат анксиолитики [4]. Важным механизмом их действия выступает модуляция ГАМК-ергической системы с помощью агонистов и антагонистов ГАМК-рецепторов в центральной нервной системе [5–9]. Широко известным агонистом ГАМК-рецепторов, используемым для влияния на страх, в том числе, при формировании УРПИ, является диазепам [10–12].

С учетом вышесказанного, в работе сопоставлено влияние пираретама, мексидола и диазетама на УРПИ в установке из трёх отсеков с целью анализа формируемого при этом следа памяти.

Материалы и методы

Работа была выполнена на 83 самцах белых беспородных крыс массой 180–200 г. Крыс содержали в пластиковых клетках при 12-часовом световом дне и неограниченном доступе к воде

и пище. Было проведено три серии опытов, в каждой из которых были контрольная и опытная группы (табл. 1). За 30 мин до эксперимента опытным животным первой серии внутривенно вводили 300 мг/кг пираретама (125 мг/мл), второй – 0,5 г/кг диазетама (2,2 мг/мл), третьей – 50 мг/кг мексидола (50 мг/мл). Контрольным животным в то же время вводили эквивалентный объем физиологического раствора.

Опыты проводили в камере размером 60×30×35 см, разделенной на три отсека. Из освещенного центрального отсека дверцы вели в темные боковые, в одном из которых при выработке УРПИ крыса получала удар током (обозначенном в дальнейшем как "опасный отсек"), а в другом нет ("безопасный отсек"). В первой сессии в камере с открытыми дверцами в течение 3 мин оценивали спонтанную двигательную активность. Во второй сессии вырабатывали УРПИ, для чего животное помещали в освещенный отсек хвостом к дальней стенке и фиксировали ЛП захода в один из темных отсеков. Затем закрывали дверь и через электрифицированный пол наносили удар током (0,7 мА) длительно – 10 с. В 3-й сессии на следующий день крысу помещали в освещенный отсек и тестировали УРПИ. Если животное не покидало центральный отсек, его поведение регистрировали в течение 5 мин.

Все эксперименты проводили согласно "Принципам надлежащей лабораторной практики" (Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434-2009) и положениям международной конвенции о "Правилах работы с экспериментальными животными" (European Communities Council Directives, November 24, 1986, 86/609/EEC).

Для оценки УРПИ помимо ЛП выхода из центрального освещенного отсека регистрировали выбор крысами одного из отсеков. Статистическую значимость увеличения ЛП при тестировании относительно исходной величины определяли с помощью парного критерия Вилкоксона; различие между опытной и контрольной группами – с помощью непарного критерия Вилкоксона; значимость частоты заходов в отсеки – с помощью критерия согласия частот [13].

Результаты и обсуждение

Экспериментальные данные, приведенные на рисунке, показывают, что удар током при переходе крысы из стартового отсека в один из темных при выработке УРПИ привел к многократному статистически значимому увеличению ЛП данной реакции при тестировании у контрольных животных в первых двух сериях

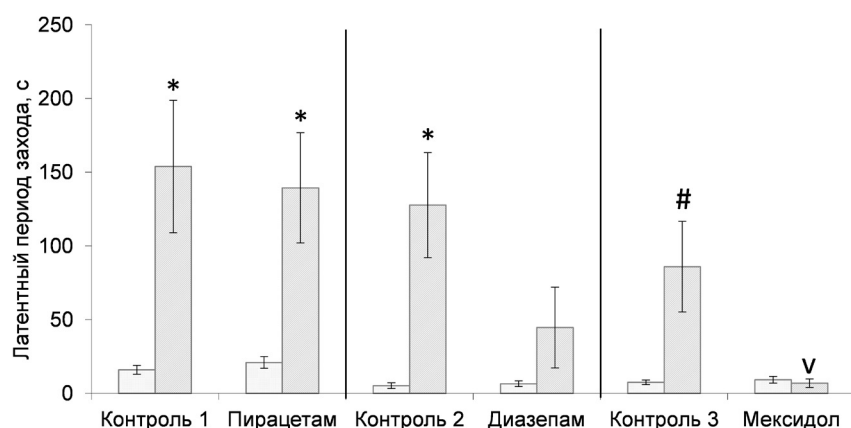


Рисунок. Латентные периоды выхода из центрального отсека.

Левые столбики в каждой паре — значение латентных периодов до обучения, правые — при тестировании.

* — значимое увеличение по сравнению с латентным периодом при обучении по парному критерию Вилкоксона ($p < 0,05$); # — тенденция к увеличению по сравнению с латентным периодом при обучении по парному критерию Вилкоксона ($p < 0,07$); v — значимое отличие от контрольной группы по критерию Вилкоксона ($p < 0,05$)

опытов. Это говорит о том, что с точки зрения общепринятого показателя успешной выработки УРПИ, каким является ЛП, обучение имеет место. Однако это не привело к предпочтению заходов животных в безопасный отсек (табл. 1). Число контрольных крыс, зашедших в безопасный отсек в первой серии, было в 4 раза меньше суммарного числа животных, оставшихся в центральном отсеке и зашедших в опасный отсек. В опытах второй серии число таких животных было даже меньше числа тех, которые выбрали

значимым, что может указывать на отсутствие влияния препарата на обучение и память в этой модели. Однако, в отличие от ситуации с контрольными животными, число опытных крыс, зашедших в безопасный отсек, в разы превышало число зашедших в опасный отсек и оставшихся в центральном отсеке. Описанное отсутствие предпочтения безопасного отсека у контрольных животных и положительное влияние пирацетама на его выбор согласуются с ранее полученными данными [14], что говорит о хорошей воспроизводимости результатов опытов.

У контрольных животных третьей серии ЛП также резко увеличился (в 7 раз), хотя это увеличение не достигло статистически значимого уровня ($p = 0,056$), что можно объяснить большим разбросом значений в данной группе за счет наличия необучившихся животных, ЛП у которых оставался низким. В противоположность описанному выше росту ЛП у контрольных и у подвергнутых влиянию пирацетама животных, у крыс под воздействием мексидола ЛП при тестировании, во-первых, не увеличился относительно исходного уровня и, во-вторых, был меньше той величины, которая была зарегистрирована

Таблица 1

Выбор животными отсека при тестировании условного рефлекса пассивного избегания

Серия	Вещество	Опасный отсек	Центральный отсек	Безопасный отсек	Z	p*
1	Физраствор (n=10)	5	3	2	3,13	0,002
	Пирацетам (n=10)	1	2	7	2,236	0,025
2	Физраствор (n=20)	16	0	4	4,111	3,984E-5
	Диазепам (n=20)	10	2	8	1,581	0,114
3	Физраствор (n=16)	4	3	9	1,061	0,289
	Мексидол (n=7)	1	0	6	3,207	0,001

* — величины критериев согласия частот и уровней значимости указаны относительно суммарной величины выбора опасного и центрального отсеков

только опасный отсек.

Различие в величинах ЛП в группе, получавшей инъекции пирацетама, и соответствующей контрольной группах не было статистически

на у контрольных животных при тестировании УРПИ. В соответствии с общепринятыми представлениями, на основе этих результатов можно было бы заключить, что препарат не только не

улучшает память, но, напротив, угнетает ее.

Однако, во-первых, это противоречит показанному ранее положительному влиянию мексидола на обучение и память [15]. Во-вторых, в данном опыте под воздействием мексидола более 85% крыс выбрали безопасный отсек, и ни одно опытное животное не осталось в центральном отсеке. Это свидетельствует о высокой эффективности мексидола в формировании следа памяти о месте нанесения болевого воздействия и упомянутого ранее "предвидения последствий захода в него". Короткий ЛП захода большинства крыс в безопасный отсек подчеркивает эффективное влияние препарата на пространственный компонент памяти в данной модели. Можно отметить, что мексидол обладает антиоксидантной активностью, которая может обеспечить выбор безопасного отсека, как это установлено в случае использования антиоксиданта карнозина [16].

Инъекция диазепама уменьшила величину ЛП ухода из центрального отсека по сравнению с ЛП у контрольных крыс. На этом основании считают, что этот агонист бензодиазепиновых рецепторов ухудшает память грызунов [11, 12]. Наши данные об отсутствии выбора безопасного отсека, приведенные в табл. 1, находятся в соответствии с этим выводом.

Из полученных результатов следует, что величины ЛП пассивного избегания и число заходов в безопасный отсек дают разнонаправленную характеристику формирования УРПИ. Это согласуется с ранее полученными результатами о том, что эти характеристики подчиняются различным количественным закономерностям [14]. Величины ЛП, характеризующие время замирания в центральном отсеке, в процитированной работе линейно зависели от силы тока и были больше всего при большем воздействии. Подобная линейная зависимость времени замирания от силы тока отмечена и другими авторами в модели посттравматического стрессового расстройства [17]. Предпочтение безопасного отсека, напротив, реже всего наблюдалось при большем воздействии, и при этом было больше всего животных, оставшихся в стартовом отсеке [14], что указывает на углубление замирания, затрудняющего выбор безопасного отсека. Следовательно, полученные данные подтверждают ранее высказанное предположение [2] о том, что процессы обучения, которые обуславливают задержку двигательной реакции и выбор безопасного отсека, имеют различную ассоциативную природу.

Увеличение ЛП и соответствующего замирания после однократного обучения, свидетельствующее об угнетении врожденной реакции перехода грызунов из светлого отсека в темный,

объясняется быстрым формированием условной эмоциональной реакции страха на основе классического обусловливания, что показано неоднократно в разных экспериментальных ситуациях [6–12, 17, 18]. Учитывая результаты опыта и данные литературы, нужно констатировать, что условнорефлекторный страх может быть увеличен с помощью усиления электроболевого воздействия и уменьшен с помощью анксиолитиков, что подтверждает его роль в формировании УРПИ.

Важно при этом отметить, что удар током при выработке УРПИ увеличивает замирание и ЛП двигательной реакции не только в той же установке, но и в челночной незатемненной камере, в которой этот удар не наносился, что свидетельствует о неспецифическом характере обусловленного страха [2]. Подобное увеличение замирания в одной камере вследствие электро кожного раздражения во второй наблюдалось и другими авторами, которые также придерживались мнения о неспецифической природе формируемого при этом условнорефлекторного страха [17, 19].

Как показывают результаты данного опыта и полученные ранее [2], быстрое формирование условной эмоциональной реакции страха, обеспечивающей резкое угнетение врожденного поведения, не приводит к быстрому формированию следа памяти, отражающему пространственные характеристики экспериментальной ситуации. Это, по-видимому, говорит о том, что запоминание места нанесения тока, пространственная дифференцировка, выбор безопасного отсека представляют собой более сложный процесс и более трудную задачу, чем формирование классического условного рефлекса.

На самом деле, необходимость выработки пространственной дифференцировки усложняет задачу, что используют для выявления нейрофармакологических воздействий на обучение и память [20, 21]. Показано, что изменение местоположения отверстия в челночной камере в ходе выработки реакции избегания резко нарушает ее воспроизведение. При этом ноотропы, не влияющие на выработку реакции избегания, способствовали усвоению пространственно видоизмененного навыка [21, 22]. На наш взгляд, именно указанное усложнение задачи, связанное с необходимостью определения безопасного отсека, объясняет, почему в нашем опыте пирacetам и мексидол, не увеличивая ЛП, отражающий выработку классической условной реакции страха, оказались более эффективными в предлагаемой модификации методики.

Наиболее интересным нам представляется

Таблица 2

Влияние препаратов на величины латентного периода выхода из центрального отсека и выбор безопасного отсека

Препарат	Влияние препарата на:	
	ЛП	Выбор безопасного отсека
Пирацетам	Отсутствует	Положительное
Мексидол	Отрицательное	Положительное
Диазепам	Отрицательное	Отсутствует

полученный в данной работе факт, ранее не отмеченный в известной нам литературе. Как сказано выше, увеличение ЛП обусловлено страхом, вызываемым током. Следовательно, отсутствие такого роста ЛП ухода из центрального отсека, наблюдаемое у крыс под воздействием мексидола, свидетельствует об отсутствии страха, несмотря на предыдущее воздействие тока. При этом ни одно животное не осталось в центральном отсеке, а 6 из 7 крыс зашли в безопасный отсек. Возможное объяснение этому основывается на двусторонних связях, которые существуют между способностью решить задачу и эмоциональным напряжением животных [23]. С этой точки зрения страх уменьшает способность решать задачу, а наличие информации, необходимой для решения задачи, уменьшает основу для возникновения страха. Мы показали ранее, что ноотропы, в том числе пирацетам и мексидол, помимо улучшения воспроизведения реакции избегания в условиях ее функционального нарушения, уменьшали и эмоциональное напряжение, выражающееся в межсигнальных реакциях, дефекации, уринации и других проявлениях [15, 21].

В наших опытах под воздействием мексидола быстро формируется след памяти, отражающий место нанесения тока, вследствие чего крысы не заходят в опасный, а выбирают безопасный отсек. В силу этого страх не увеличивается относительно исходной величины, и ЛП после удара током, в свою очередь, также не увеличивается, в отличие от того, что имеет место у контрольных животных.

Таким образом, полученные в работе результаты подтвердили ранее высказанное предположение [2] о различии ассоциативных процессов, вызывающих увеличение ЛП и выбор безопасного отсека. Торможение двигательной

реакции, приводящее к увеличению ЛП ухода из центрального отсека, связано с образованием условной эмоциональной реакции страха, не соотнесенной с местом электрокожного раздражения. Выбор безопасного отсека обусловлен формированием пространственной памяти, обеспечивающей дифференцировку между опасным и безопасным отсеками. Для дальнейшего анализа роли этих ассоциативных процессов мы использовали препараты из класса ноотропов, предназначенных для стимуляции когнитивных и мнестических процессов, и анксиолитиков, уменьшающих тревогу и страх. В обобщенном виде полученные результаты о влиянии использованных препаратов на УРПИ представлены в табл. 2. Из полученных данных следует, что под воздействием ноотропов увеличивается предпочтение безопасного отсека, в то время как ЛП не увеличивается относительно контрольных величин. Анксиолитик диазепам, наоборот, уменьшил ЛП выхода из центрального отсека, но не повлиял на предпочтение. Эти дифференцированные фармакологические эффекты подтверждают, что УРПИ основан на формировании условной реакции страха, которая вызывает увеличение латентного периода ухода из центрального отсека, и памяти о месте электроболевого воздействия, которая обеспечивает выбор безопасного отсека.

Работа выполнена при финансовой поддержке госзадания «Нейробиологические основы поведения животных» (номер гостемы 11-1-16, номер ЦИТИС АААА-А16-116021660055-1).

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. Bures J., Burešová O., Huston J. P. Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. N.Y.: Elsevier, 1976. 290 pp.
2. Inozemtsev A.N. Analysis of the memory trace nature in passive avoidance response // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 2. P. 53–57.
3. Malik R., Sangwan A., Saihgal R., Jindal D.P., Piplani P. Towards better brain management:

- nootropics // *Curr. Med. Chem.* 2007. Vol. 14. N 2. P. 123–131.
4. *Castanheira L., Ferreira M.F., Sebastião A.M., Telles-Correia D.* Anxiety assessment in pre-clinical tests and in clinical trials: a critical review // *Curr. Top. Med. Chem.* 2018. Vol. 18. N 19. P. 1656–1676.
5. *Dubrovina N.I., Zinov'ev D.R.* Contribution of GABA receptors to extinction of memory traces in normal conditions and in a depression-like state // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2008. Vol. 38. N 8. P. 775–779.
6. *Pavlova I.V., Rysakova M.P.* Effects of administration of an agonist and an antagonist of GABAA receptors into the basolateral nucleus of the amygdala on the expression and extinction of fear in rats with different freezing durations // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2016. Vol. 46. N 2. P. 205–214.
7. *Ehrlich I., Humeau Y., Grenier F., Ciocchi S., Herry C., Lüthi A.* Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory // *Neuron.* 2009. Vol. 62. N 6. P. 757–771.
8. *McEown K., Treit D.* A2 GABAA receptor sub-units in the ventral hippocampus and $\alpha 5$ GABAA receptor sub-units in the dorsal hippocampus mediate anxiety and fear memory // *Neuroscience.* 2013. N 252. P. 169–177.
9. *Smith K.S., Engin E., Meloni E.G., Rudolph U.* Benzodiazepine-induced anxiolysis and reduction of conditioned fear are mediated by distinct GABAA receptor subtypes in mice // *Neuropharmacology.* 2012. Vol. 63. N 2. P. 250–258.
10. *Kim D.H., Kim J.M., Park S.J., Lee S., Shin C.Y., Cheong J.H., Ryu J.H.* Hippocampal extracellular signal-regulated kinase signaling has a role in passive avoidance memory retrieval induced by GABAA receptor modulation in mice // *Neuropsychopharmacology.* 2012. Vol. 37. N 5. P. 1234–1244.
11. *Tsuji M., Takeda H., Matsumiya T.* Modulation of passive avoidance in mice by the 5-HT1A receptor agonist flesinoxan: comparison with the benzodiazepine receptor agonist diazepam // *Neuropsychopharmacology.* 2003. Vol. 28. N 4. P. 664–674.
12. *Vasudevan M., Parle M.* Pharmacological evidence for the potential of *Daucus carota* in the management of cognitive dysfunctions // *Biol. Pharm. Bull.* 2006. Vol. 29. N 6. P. 1154–1161.
13. *Кулаичев А.П.* Методы и средства анализа данных в среде Windows/STADIA. М.: НПО «Информатика и компьютеры», 1999. 241 с.
14. *Иноземцев А.Н., Бельник А.П., Островская Р.У.* Изучение условного рефлекса пассивного избегания в модифицированной трех камерной установке // *Эксп. клин. фармакол.* 2007. Т. 70. № 2. С. 67–69.
15. *Inozemtsev A.N.* Biological origins of protective mechanisms activated by the disruption of higher nervous activity // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2009. Vol. 64. N 2. P. 57–62.
16. *Berezhnaya D.S., Bokieva S.B., Stvolinskii S.L., Fedorova T.N., Inozemtsev A.N.* Effect of carnosine on conditioned passive avoidance response in the norm and under hypoxia conditions // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 3. P. 105–109.
17. *Siegmund A., Wotjak C.T.* A mouse model of posttraumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear // *J. Psychiatr. Res.* 2007. Vol. 41. N 10. P. 848–860.
18. *Konorski J.* Integrative activity of the brain: An interdisciplinary approach. Chicago; London: Univ. Chicago Press, 1967. 531 pp.
19. *Toropova K.A., Anokhin K.V.* Modeling of post-traumatic stress disorder in mice: nonlinear relationship with the strength of the traumatic event // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2019. Vol. 49. N 7. P. 875–886.
20. *Stuchlík A., Petrásek T., Prokopová I., Holubová K., Hatalová H., Valeš K., Kubík S., Dockery C., Wesierska M.* Place avoidance tasks as tools in the behavioral neuroscience of learning and memory // *Physiol. Res.* 2013. Vol. 62. N 1. P. 1–19.
21. *Иноземцев А.Н., Капица И.Г., Гарибова Т.Л., Бокиева С.Б., Воронина Т.А.* Сопоставление влияния ноотропов и анксиолитиков на функциональные нарушения реакции избегания // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология.* 2004. № 3. С. 24–30.
22. *Inozemtsev A.N., Agapitova A.E., Bokieva S.B., Glazova N.Yu., Levitskaya N.G., Kamenskii A.A., Myasoedov N.F.* Differently directed influences of semax on the formation and functional impairments of an active avoidance reaction in rats // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2015. Vol. 45. N 2. P. 173–178.
23. *Simonov P.V.* The emotional brain. physiology, neuroanatomy, psychology and emotion. N.Y.; London: Plenum Press, 1986. 267 pp.

Поступила в редакцию 27.06.2019 г.

После доработки 26.08.2019 г.

Принята в печать 02.09.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

EFFECTS OF DIAZEPAM, PIRACETAM AND MEXIDOL ON PASSIVE AVOIDANCE RESPONSE

A.N. Inozemtsev^{1,*}, D.S. Berezhnoy^{1, 2}, A.V. Novoseletskaya¹¹*Department of Higher Nervous Activity, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*²*Laboratory of Clinical and Experimental Neurochemistry, Scientific Center of Neurology, Volokolamsk Highway 80, Moscow, 125367, Russia***e-mail: a_inozemtsev@mail.ru*

In experiments on rats, we compared the influence of anxiolytic diazepam and nootropics piracetam and mexidol on passive avoidance conditioning (PAC) in a three compartment apparatus that consisted of a light compartment, a dark dangerous compartment in which foot shock was delivered and a dark safe one where the rats were not punished. Electric foot shock during PAC caused a sharp increase in the latent period of the central compartment leaving during the testing in the control animals, but did not lead to the safe compartment choice. Based on these data on the differential impact of the foot shock on PAC, we formulated the assumption that learning processes, which determined the motor response delay and the safe compartment selection, had different associative nature. The increase in the latent period is associated with the classical fear conditioning regardless of the place of the current impact. The safe compartment choice, on the contrary, is associated with the memory trace formation about the location of the foot shock exposure. The use of pharmacological substances that affect fear and memory in different ways gave additional arguments in favor of the assumption of various associative processes that determined PAC. Reducing the level of fear with diazepam reduced the latent period of motor response relative to the control value, but did not affect the choice of a safe compartment. In contrast, the mnemotropic properties of piracetam and mexidol increased the preference for a safe compartment without increasing the latent period. These differential pharmacological effects confirm that PAC is based on the conditioned responses of fear, which causes an increase in latent period of leaving the central compartment, and on the memory of the electrical exposure location which provides the safe compartment choice.

Keywords: *modified passive avoidance, memory, diazepam, piracetam, mexidol, conditioned fear, safe compartment choosing*

Сведения об авторах

Иноземцев Анатолий Николаевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-50-01;
e-mail: a_inozemtsev@mail.ru

Бережной Даниил Сергеевич — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ, науч. сотр. лаб. клинической и экспериментальной нейрхимии ФГБНУ «Научный центр неврологии». Тел.: 8-495-939-50-01;
e-mail: b@neurobiology.ru

Новоселецкая Анна Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-50-01;
e-mail: neuron1211@rambler.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 581.144.2:577.175.142

УЧАСТИЕ СЕНСОРА НИТРАТОВ NRT1.1 В РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ ЦИТОКИНИНОВ И УДЛИНЕНИЯ КОРНЕЙ В НОРМЕ И ПРИ ДЕФИЦИТЕ АЗОТА

А.В. Коробова^{1, *}, Г.Р. Ахиярова¹, В.В. Федяев², Р.Г. Фархутдинов², С.Ю. Веселов^{1, 2},
Г.Р. Кудоярова¹¹Уфимский институт биологии УФИЦ РАН, Россия, 450054, г. Уфа, Проспект Октября, д. 69;²Башкирский государственный университет, Россия, 450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, д. 32

*e-mail: muksin@mail.ru

Транспортер нитратов NRT1.1 действует как сенсор нитратов, запуская определенные реакции растений. В то же время фитогормоны цитокинины часто участвуют в регуляции ростовых ответов растений на изменение уровня нитратов. В данной работе мы проверили предположение, что сенсор NRT1.1 способен участвовать в контроле уровня цитокининов. Для этого мы изучили влияние мутации гена NRT1.1 на гормональные и ростовые реакции растений при удалении азота из среды. Опытными объектами были растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) исходного экотипа Columbia и мутантные по гену NRT1 (*chl1-5*). Использовали два варианта экспериментального дизайна: (1) растения выращивали на растворе Хогланда-Арнона, удаление азота осуществляли путем замены нитратов на хлориды; (2) использовалась среда Прянишникова, азотное голодание создавали путем удаления нитрата аммония. Мы впервые показали, что мутация NRT1.1 приводит к снижению уровня цитокининов в корнях *chl1-5*, в результате чего у них формируются более длинные корни по сравнению с растениями Columbia. Содержание цитокининов в растениях Columbia снижалось в ответ на оба варианта исключения азота из среды, и параллельно этим изменениям уровня гормонов ускорялось удлинение корней. Изменение концентрации цитокининов и удлинения корней у мутанта по сенсору NRT1.1 было зарегистрировано лишь при удалении нитрата аммония из среды Прянишникова, но не было зарегистрировано при замене нитрата на хлорид в среде Хогланда-Арнона. Результаты свидетельствуют об участии сенсора NRT1.1 в регуляции уровня цитокининов и скорости элонгации корней при удалении нитратов, но не ионов аммония, что подтверждает специфичность ответа.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, трансценптор NRT1.1, рост корней, цитокинины, дефицит азота, иммуногистохимическая локализация, гидропоническая культура

Изменение роста и развития корней — важная адаптивная реакция, обеспечивающая оптимизацию поглощения элементов минерального питания и воды растением. При изучении реакции растений на изменение уровня нитратов цитокинины привлекают особо пристальное внимание [1, 2]. Наиболее детально изучено влияние возвращения растений на среду с нитратами после их выращивания на среде без азота [3]. Показано, что при этом происходит индукция экспрессии генов, контролирующих синтез цитокининов, и это приводит к повышению уровня данных гормонов в растениях арабидопсиса [4] и риса [5]. Влиянию удаления нитратов из питательной среды уделялось меньше внимания, хотя

в отдельных работах показано снижение уровня цитокининов при дефиците азота [6]. Поскольку обработка цитокининами ингибировала рост корней [7], а пониженный уровень цитокининов у трансгенных растений сопровождался ускорением их роста [8], активацию роста корней при дефиците нитратов можно объяснить уменьшением содержания этих гормонов.

Принимая во внимание значение цитокининов в реакции растений на дефицит азота, важно было понять, каким образом растения воспринимают уровень нитратов, регулируя содержание цитокининов и рост. Важная роль в восприятии нитратного сигнала приписывается переносчику нитратов NRT1.1 [9]. Показано,

что у мутанта *chl1-5* по этому гену при добавлении нитратов в среду без азота не происходит индукции экспрессии генов, кодирующих переносчики нитратов и ферменты, участвующие в их метаболизме. На основании этих результатов предполагается, что NRT1.1 сочетает функции сенсора и переносчика нитратов, что позволило назвать его трансцептором (transceptor). Его участие в регуляции роста боковых корней связано с тем, что NRT1.1 функционирует как NO_3^- -зависимый переносчик ауксинов [10]. В условиях низкого содержания нитратов он обеспечивает отток ауксинов из примордиев боковых корней, что предотвращает их удлинение. Менее внимания было уделено возможному участию трансцептора в регуляции уровня цитокининов и роста корней. Цель данной работы состояла в том, чтобы выявить влияние мутации по гену NRT1.1 на содержание цитокининов и фенотип растений арабидопсиса при их выращивании на полной питательной среде и при удалении из нее нитратов и таким образом проверить, участвует ли сенсор NRT1.1 в гормональном и ростовом ответе на дефицит азота.

Материалы и методы

Объектом исследования служили растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* [L.] Heynh.) экотипа Columbia (Col-0) и мутанта по трансцептору нитратов NRT1.1 (*chl1-5*). После стратификации на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри в течение 3 сут при температуре 4°C семена переносили в сосуды (100 мл) с песком, насыщенным раствором Прянишникова, в котором нитрат аммония является единственным источником азота, или Хогланда-Арнона, содержащим азот в форме нитратов калия и кальция, и выращивали в климатической камере (MLR-350H, Sanyo, Япония), как описано ранее [7]. Оводненность песка поддерживали на уровне 65% от полной влагоемкости. Через 2 нед. после переноса в климатическую камеру растения помещали в лунки полистироловых микропланшетов с отверстиями, плавающих по поверхности питательного раствора. В предварительных экспериментах с выращиванием растений на жидкой среде разбавление стандартных растворов Прянишникова и Хогланда-Арнона в 10 раз приводило к максимальному накоплению массы растений Columbia, поэтому разведенные в 10 раз среды были выбраны для дальнейших исследований. Применяли два варианта удаления азота из среды. (1) Растения размещали на среде Прянишникова, а при моделировании азотного голодания их переносили в контейнер со средой Прянишникова без нитрата аммония. (2) Поло-

вина растений получала раствор Хогланда-Арнона, а вторая половина — модифицированный раствор, в котором нитраты калия и кальция были заменены на хлориды, как описано ранее [11]. Растения выращивали при непрерывной аэрации. Через 2 сут выращивания в гидропонике ткани растений брали на анализ цитокининов, через 4 сут — измеряли длину корней.

Для экстракции цитокининов корни растительного гомогенизировали в 80%-ном этаноле и инкубировали в течение ночи при 4°C. После фильтрации и выпаривания этанола водный остаток подвергали очистке на картридже C18 (Waters, США) как описано ранее [12]. После испарения растворителя сухой остаток растворяли в 0,02 мл 80%-ного этанола и разделяли метаболиты цитокининов при помощи тонкослойной хроматографии [12]. Различные формы цитокининов элюировали в течение 15 ч 0,1 М фосфатным буфером (pH 7,2–7,4) из соответствующих зон, идентифицированных по положению метчиков в УФ-свете. Затем аликвоту в серии разведений добавляли в лунки планшетов и проводили иммуноферментный анализ с помощью антител против транс-зеатинрибозида, высокоспецифичных к производным транс-зеатина [12].

Для иммунолокализации цитокининов в продольных срезах кончиков корней использовали специфические кроличьи антитела к зеатинрибозиду. Растения фиксировали в растворе 4%-ного параформальдегида (Riedel-deHaen, Германия) и 0,1%-ного глутарового альдегида (Sigma, Германия). Через 2 ч кончики корней отмывали от фиксатора и заключали в блоки из агарозы, как описано ранее [13]. Гистологические срезы толщиной 1,5 мкм готовили с помощью ротационного микротомы (HM 325, MICROM Laborgerate, Германия). Иммунолокализацию гормонов проводили, как описано ранее [14]. Препараты анализировали с помощью светового микроскопа Axio Imager.A1 (Carl Zeiss Jena, Германия), оборудованного цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss Jena, Германия).

Активность цитокиноксидазы в корнях определяли, как описано ранее [7]. Снижение количества изопентениладенина (ИП) в результате распада определяли при помощи иммуноферментного анализа как описано ранее [12], но с использованием специфических антител против изопентениладенозина.

Статистический анализ производили с использованием Microsoft Excel. На рисунках представлены средние значения показателей, указаны их стандартные ошибки. Достоверные различия отмечены различными буквами ($p < 0,05$, t-тест). При измерении длины главного корня биологи-

ческим повтором (n) служило одно растение, для количественного определения цитокининов — 30 растений.

Результаты

При удалении нитрата аммония из среды Прянишникова масса растений Col-0 снижалась на 29% (с $9,7 \pm 0,7$ до $6,9 \pm 0,4$ мг в присутствии и в отсутствие азота в среде соответственно). Замена нитратов калия и кальция на хлориды в растворе Хогланда-Арнона вызывала сходное (на 31%) снижение массы растений Col-0 (с $10,9 \pm 0,7$ до $7,5 \pm 0,3$ мг в растворе с нитратами и без них соответственно). Это указывает на то, что подавление роста было следствием дефицита азота, а токсичность хлорида не проявлялась, вероятно, из-за низкой концентрации этих анионов (1,5 мМ).

Измерение длины корней показало, что они были длиннее у *chl1-5* по сравнению с Col-0 в случае как среды Хогланда-Арнона, так и среды Прянишникова (рис. 1). Удаление NH_4NO_3 из среды Прянишникова приводило к удлинению корней растений обоих генотипов по сравнению с контрольными, получавшими азот, растениями. Удаление нитратов из среды Хогланда-Арнона также сопровождалось увеличением длины

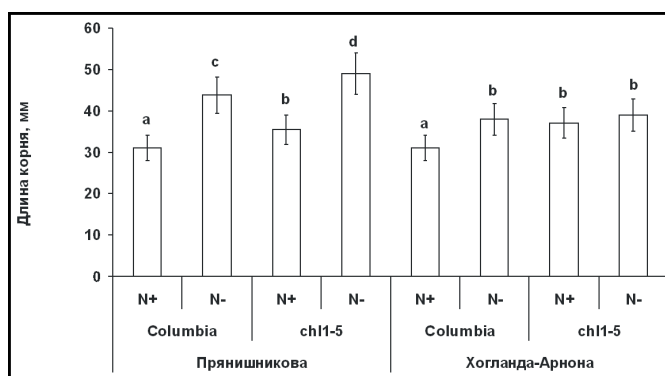


Рис. 1. Длина главного корня 18-суточных растений арабидопсиса исходного экотипа Columbia и мутантных по трансцептору NRT1.1 (*chl1-5*), получавших разбавленный в 10 раз раствор Прянишникова или Хогланда-Арнона через 4 сут после удаления азота (N-) из среды. Из раствора Прянишникова исключали нитрат аммония, в растворе Хогланда-Арнона нитраты калия и кальция были заменены на хлориды (n = 30).

корней растений Col-0, однако на удлинении корней *chl1-5* данное воздействие не сказывалось. Мы зарегистрировали более высокое содержание цитокининов в корнях растений Col-0 по сравнению с корнями *chl1-5* (рис. 2). Удаление NH_4NO_3 из среды Прянишникова снижало суммарное содержание производных зеатина в корнях растений обоих генотипов. Реакция на замену нитратов калия и кальция на хлориды

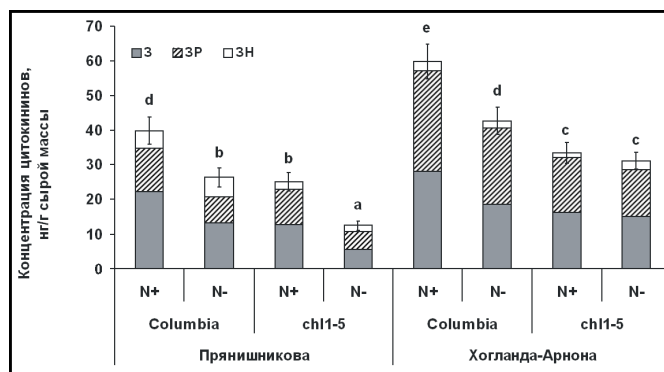


Рис. 2. Суммарная концентрация трех форм цитокининов (зеатина (Z), его рибозида (ZR) и нуклеотида (ZN)) в корнях 16-суточных растений арабидопсиса исходного экотипа Columbia и мутантных по трансцептору NRT1.1 (*chl1-5*), получавших разбавленный в 10 раз раствор Прянишникова или Хогланда-Арнона через 2 сут после удаления азота (N-) из среды. Из раствора Прянишникова исключали нитрат аммония, в растворе Хогланда-Арнона нитраты калия и кальция были заменены на хлориды (n = 9).

в растворе Хогланда-Арнона была иной: у растений Col-0 содержание цитокининов в корнях снижалось, а у *chl1-5* оставалось на уровне контроля (растений, получавших нитраты калия и кальция). Сравнение длины корней и концентрации цитокининов у растений разных генотипов на фоне достаточной обеспеченности азотом и его дефицита позволяет заметить соответствие гормональной и ростовой реакции растений на генетическую модификацию и удаление азота из среды. Между уровнем цитокининов и длиной корней (выраженных как процент от величины показателей у Col-0, получавших азот) выявлена высокая корреляция ($r = -0,9$) для среды Прянишникова и Хогланда-Арнона.

Активность цитокиноксидазы у растений Col-0 снижалась при дефиците азота в среде (440 ± 36 и 253 ± 25 нг ИП/(ч г сырой массы) в корнях Col-0 в присутствии и в отсутствие нитратов соответственно), в отличие от растений *chl1-5*, у которых уровень активности фермента не зависел от присутствия азота в среде (243 ± 22 и 216 ± 19 нг ИП/(ч г сырой массы) в корнях *chl1-5* в присутствии и в отсутствие нитратов соответственно). Активность фермента в корнях у Col-0 была выше, чем у *chl1-5*.

Иммуногистохимическая локализация зеатина показала уменьшение интенсивности окраски на цитокинины в кончиках корней Col-0 при удалении нитратов из раствора Хогланда-Арнона и отсутствие значимых различий в уровне окрашивания в случае *chl1-5* (рис. 3). Небольшое снижение окраски кончиков корней растений *chl1-5* по сравнению с Col 0, росших на немодифицированном растворе Хогланда-Арнона, не

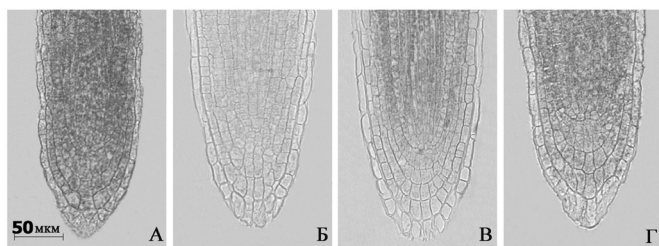


Рис. 3. Иммулокализация цитокининов в кончиках корней 16-суточных растений арабидопсиса. Растения исходного экотипа Columbia (А, Б) и мутанты по трансцептору нитратов NRT1.1 *chl1-5* (В, Г), получавших нитраты (А, В) или 2 сут росших на безазотной среде (Б, Г).

было статистически достоверным.

Обсуждение

Снижение содержания цитокининов, зарегистрированное нами в корнях экотипа Col-0 при удалении из среды нитратов (рис. 2), соответствует данным литературы о влиянии уровня азота на содержание цитокининов [3, 6]. Несмотря на то, что работ, где определялось содержание цитокининов при дефиците азота, не так много, снижение уровня цитокининов при данном воздействии широко обсуждается [2, 15]. Влияние уровня нитратов на содержание цитокининов в основном изучали как реакцию на повышение их концентрации в питательной среде, и в этих экспериментах была показана активация синтеза цитокининов [3]. Лишь сравнительно недавно было показано снижение содержания цитокининов под влиянием дефицита нитратов у растений арабидопсиса [15].

Поскольку цитокининам приписывают важную роль в адаптации растений к уровню нитратов, важно понять, какие сенсорные системы отвечают за эту реакцию. Хотя сенсорная функция «трансцептора» нитратов NRT1.1 была показана на примере регуляции активности генов, контролирующих транспорт и метаболизм нитратов [9], участие NRT1.1 в регуляции уровня цитокининов не было выявлено. Эту функцию сенсора лишь предполагали Киба с соавт. [15] на основе результатов анализа уровня транскриптов множества генов мутанта по сенсору нитратов *chl1-5*, проведенного Вангом с соавт. [16]. Во втором приложении к данной работе показан пониженный уровень экспрессии генов *AtIPT3* и *AtIPT4*, ответственных за синтез цитокининов. Нами впервые показано, что мутация по гену, кодирующему NRT1.1, действительно приводит к пониженному содержанию цитокининов в корнях растений (рис. 2), что подтверждает участие «трансцептора» нитратов в поддержании уровня этих гормонов. Более низкий уровень содержания цитокининов нельзя объяс-

нить повышенным уровнем их окислительного распада, поскольку активность цитокининоксидазы у растений *chl1-5* была не выше, а ниже, чем у Col-0. Скорее этот феномен связан с пониженным уровнем синтеза цитокининов у мутанта, что соответствует данным литературы об уровне экспрессии гена *AtIPT3* и *AtIPT4* у этого мутанта [16]. Известно, что активность цитокининоксидаз возрастает под влиянием цитокининов, обеспечивая гомеостатирование их уровня [17]. Следовательно, низкая активность цитокининоксидазы может быть результатом снижения уровня цитокининов, содержание которых уменьшилось из-за ингибирования их синтеза.

Особый интерес представляют наши данные, свидетельствующие об отсутствии изменений уровня цитокининов при удалении нитратов из среды Хогланда-Арнона у растений *chl1-5* в отличие от растений Col-0 (рис. 2). Эти результаты подтверждают предположение о том, что функционально полноценный сенсор NRT1.1 необходим для восприятия дефицита нитратов и запуска реакций, направленных на снижение содержания цитокининов в растениях при данном воздействии. Важно отметить, что удаление NH_4NO_3 из питательной среды (в отличие от удаления нитрата калия и кальция) приводило к снижению содержания цитокининов в корнях растений *chl1-5* наравне с Col-0. У растений выявлен сенсор не только нитратов, но и ионов аммония. Так, у арабидопсиса обнаружена рецептороподобная протеинкиназа CAP1, участвующая в восприятии (sensing) концентрации аммония и его гомеостатировании, а также играющая важную роль в регуляции полярного роста корневых волосков [18]. Как известно, уровень аммония влияет на экспрессию генов, контролирующих синтез цитокининов [5]. Хотя на экспрессию этих генов влияет не сам аммоний, а его биохимическое производное глутамин [5], снижение содержания цитокининов у дефицитного по NRT1.1 мутанта при удалении нитрата аммония из среды Прянишникова можно объяснить способностью растений реагировать на концентрации аммония и продуктов его метаболизма.

Данные иммуногистохимической локализации зеатина в кончиках корней (рис. 3) подтвердили основную закономерность, зарегистрированную с помощью иммуноферментного анализа (рис. 2). Так, более слабое окрашивание зеатина в корнях Col-0, перенесенных на раствор Хогланда-Арнона, не содержащий нитратов, свидетельствует о снижении уровня этого гормона в кончиках корней и согласуется с более низким общим содержанием цитокининов в корнях этих растений. Отсутствие значительных изменений

в окрашивании у *chl1-5* согласуется с количественным измерением общего содержания цитокининов в корнях (рис. 2), что свидетельствует об отсутствии зависимости уровня цитокининов у мутанта от присутствия нитратов в питательном растворе.

Изменение содержания цитокининов в корнях как под влиянием генетических факторов, так и изменения условий выращивания растений сопровождалось соответствующими изменениями скорости удлинения их корней. Так, (1) у мутанта пониженный уровень цитокининов в корнях сочетался с большей длиной корней по сравнению с растениями исходного генотипа, (2) снижение содержания этих гормонов у Col-0 сопровождалось увеличением длины корней под влиянием дефицита азота, (3) удлинение корней ускорялось в соответствии со снижением в них содержания цитокининов у *chl1-5* при удалении нитрата аммония из среды Прянишникова, а (4) отсутствие изменений в уровне цитокининов соответствовало отсутствию изменений длины их корней при удалении нитратов из среды Хогланда-Арнона. Эти результаты вполне согласуются с данными литературы о том, что понижение уровня цитокининов в корнях растений ускоряет их удлинение за счет уменьшения ингибирую-

щего действия цитокининов на деление клеток корневой меристемы [8]. Более длинные корни у растений NRT1.1 описаны нами впервые. Очевидно, это связано с тем, что до сих пор фенотип этого мутанта изучали, выращивая растения на агаровых пластинах с добавлением сахара, что оказывает специфическое влияние на развитие корневой системы [19]. Ранее нами показано, что гидропоническая культура более адекватно имитирует особенности роста корневой системы в почве [20].

Известно, что мутации NRT1.1, в некотором отношении, лишают растения способности чувствовать нитраты, а цитокинины служат индикаторами доступности элементов питания [21]. Приведенные нами данные свидетельствуют об участии сенсора нитратов NRT1.1 в регуляции уровня цитокининов в растениях, т.е. в поддержании их содержания в присутствии нитратов и в его понижении при дефиците этих ионов. Изменения содержания корневых цитокининов коррелируют с длиной корней и, очевидно, регулируют скорость их удлинения.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sakakibara H., Takei K., Hirose N. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development // Trends Plant Sci. 2006. Vol. 11. N. 9. P. 440–448.
2. Kudoyarova G.R., Dodd I.C., Veselov D.S., Rothwell S.A., Veselov S.Y. Common and specific responses to availability of mineral nutrients and water // J. Exp. Bot. 2015. Vol. 66. N. 8. P. 2133–2144.
3. Takei K., Takahashi H., Sugiyama T., Yamaya T., Sakakibara H. Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin // J. Exp. Bot. 2002. Vol. 53. N. 370. P. 971–977.
4. Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T., Sakakibara H. *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis* // Plant Cell Physiol. 2004. Vol. 45. N 8. P. 1053–1062.
5. Kamada-Nobusada T., Makita N., Kojima M., Sakakibara H. Nitrogen-dependent regulation of de novo cytokinin biosynthesis in rice: the role of glutamine metabolism as an additional signal // Plant Cell Physiol. 2013. Vol. 54. N 11. P. 1881–1893.
6. Salama A., Wareing P.F. Effects of mineral-nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (*Helianthus annuus*) // J. Exp. Bot. 1979. Vol. 30. N. 118. P. 971–981.
7. Korobova A.V., Vysotskaya L.B., Vasinskaya A.N., Kuluev B.R., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. Dependence of root biomass accumulation on content and metabolism of cytokinins in ethylene-insensitive plants // Russ. J. Plant Physiol. 2016. Vol. 63. N 5. P. 636–643.
8. Ivanov V.B., Filin A.N. Cytokinins regulate root growth through its action on meristematic cell proliferation but not on the transition to differentiation // Funct. Plant Biol. 2017. Vol. 45. N. 2. P. 215–221.
9. Gojon A., Krouk G., Perrine-Walker F., Laugier E. Nitrate transceptor(s) in plants // J. Exp. Bot. 2011. Vol. 62. N. 7. P. 2299–2308.
10. Krouk G., Mirowski P., LeCun Y., Shasha D.E., Coruzzi G.M. Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate // Genome Biol. 2010. Vol. 11: R123.
11. Yu C., Liu Y., Zhang A., Su S., Yan A., Huang L., Ali I., Liu Y., Forde B.G., Gan Y. MADS-

box transcription factor OsMADS25 regulates root development through affection of nitrate accumulation in rice // PLoS One. 2015. Vol. 10. N 8: e0135196.

12. Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Arkhipova T.N., Zaytsev D.Yu., Prinsen E., Egutkin N.L., Medvedev S.S., Veselov S.Yu. Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) // J. Exp. Bot. 2014. Vol. 65. N. 9. P. 2287–2294.

13. Wu S., Baskin T.I., Gallagher K.L. Mechanical fixation techniques for processing and orienting delicate samples, such as the root of *Arabidopsis thaliana*, for light or electron microscopy // Nat. Protoc. 2012. Vol. 7. N. 6. P. 1113–1124.

14. Akhiyarova G.R., Korobova A.V., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R., Veselov D.S. Effects of root cutting on cytokinin content in the shoot apex cells of *Arabidopsis* plants // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. Vol. 73. N 3. P. 172–177.

15. Kiba T., Kudo T., Kojima M., Sakakibara H. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin // J. Exp. Bot. 2011. Vol. 62. N. 4. P. 1399–1409.

16. Wang R., Xing X., Wang Y., Tran A., Crawford N.M. A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene NRT1.1 //

Plant Physiol. 2009. Vol. 151. N. 1. P. 472–478.

17. Motyka V., Vankova R., Capkova V., Petrasek J., Kaminek M., Schmülling T. Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion // Physiol Plant. 2003. Vol. 117. N. 1. P. 11–21.

18. Bai L., Ma X., Zhang G., Song S., Zhou Y., Gao L., Miao Y., Song C.-P. A receptor-like kinase mediates ammonium homeostasis and is important for the polar growth of root hairs in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2014. Vol. 26. N. 4. P. 1497–1511.

19. Roycewicz P., Malamy J.E. Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on *Arabidopsis* root and shoot system growth in laboratory assays // Philos. Trans. R. Soc. London, B. 2012. Vol. 367. N. 1595. P. 1489–1500.

20. Trapeznikov V.K., Ivanov I.I., Kudoyarova G.R. Effect of heterogeneous distribution of nutrients on root growth, ABA content and drought resistance of wheat plants // Plant Soil. 2003. Vol. 252. N. 2. P. 207–214.

21. Ruffel S., Krouk G., Ristova D., Shasha D., Birnbaum K.D., Coruzzi G.M. Nitrogen economics of root foraging: Transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signalling for N supply vs. demand // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011. Vol. 108. N. 45. P. 18524–18529.

Поступила в редакцию 07.07.2019 г.

После доработки 26.08.2019 г.

Принята в печать 02.09.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

PARTICIPATION OF NITRATE SENSOR NRT1.1 IN THE CONTROL OF CYTOKININ LEVEL AND ROOT ELONGATION UNDER NORMAL CONDITIONS AND NITROGEN DEFICIT

A.V. Korobova^{1,*}, G.R. Akhiyarova¹, V.V. Fedyaev², R.G. Farkhutdinov², S.Yu. Veselov^{1,2},
G.R. Kudoyarova¹

¹Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Prospekt Oktyabrya 69, 450054, Ufa, Russia;

²Bashkir State University, Zaki Validi st. 32, 450076, Ufa, Russia

*e-mail: muksin@mail.ru

NRT1.1 nitrate transporter acts as nitrate sensor in some plant responses. We tried to check if it may be involved in the control of cytokinin level in the plants known to be involved in the growth responses to nitrate level. In accordance, we followed the effects of NRT1.1 gene mutation in *chl1-5* plants on hormonal and growth responses to nitrogen starvation. Two types of experimental design were used: (1) plants were placed on either Hoagland-Arnon or modified solution, where potassium and calcium nitrates were substituted with their chlorides; (2) Pryanishnikov medium was used, where ammonium nitrate serves as the source of nitrogen, starvation being modeled by its withdrawal from the medium. We were first to show that mutation of the NRT1.1 resulted in a decline in cytokinin level in the roots of *chl1-5*, while roots of wild type plants were longer in accordance with lower cytokinin content in them, the hormone being known to inhibit root elongation. Cytokinin content decreased in Columbia plants paralleled by acceleration of root elongation in response to both variants of nitrogen starvation, while *chl1-5* roots responded in this way only when nitrogen was withdrawn from Pryanishnikov solution, while substitution of nitrates by chlorides in the Hoagland-Arnon solution had no effects on either *chl1-5* roots length or cytokinin content in them. The results suggested the involvement of NRT1.1 transceptor in the control of cytokinin level and root elongation rate in the nitrate, but not in ammonium starved plants, confirming the specificity of response.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, NRT1.1 transceptor, root growth, cytokinins, nitrogen starvation, immunohistochemical localization, hydroponics

Сведения об авторах

Коробова Алла Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории физиологии растений Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-53-62;
e-mail: muksin@mail.ru

Ахиярова Гузель Рифовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории физиологии растений Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-53-62;
e-mail: akhayarova@rambler.ru

Федяев Вадим Валентинович — канд. биол. наук, доц. кафедры биохимии и биотехнологии биологического факультета Башкирского государственного университета.
Тел.: 8-347-272-46-33; e-mail: vadim.fedyayev@gmail.com

Фархутдинов Рашид Габдулхаевич — докт. биол. наук, проф., зав. кафедры биохимии и биотехнологии биологического факультета Башкирского государственного университета.
Тел.: 8-347-272-46-33; e-mail: frg2@mail.ru

Веселов Станислав Юрьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биохимии и биотехнологии биологического факультета Башкирского государственного университета.
Тел.: 8-347-272-46-33; e-mail: veselov.stanislav5@yandex.ru

Кудоярова Гузель Радомесовна — докт. биол. наук, проф., зав. лабораторией физиологии растений Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-53-62;
e-mail: guzel@anrb.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.033

ВЛИЯНИЕ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* IPPAS C-1 (CHLOROPHYCEAE) НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И МИКРОБИОМ ПОЧВЫ ПРИ ВОЗДЕЛЫВАНИИ ФАСОЛИ

А.А. Кублановская¹, С.А. Хапчаева², В.С. Зотов², П.А. Зайцев¹, Е.С. Лобакова¹,
А.Е. Соловченко^{1,*}

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

²ФИЦ «Биотехнологии РАН», Российская академия наук, Россия, 119071,
г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

*e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

В настоящее время остро стоит проблема дефицита сырья для химических фосфорных удобрений и снижения неблагоприятного воздействия их использования на окружающую среду. К перспективным направлениям ее решения относится использование биоудобрений из обогащенной фосфором суспензии клеток (биомассы) микроводорослей, однако многие фундаментальные аспекты влияния таких удобрений на биологическую активность и микробиом почв остаются неизвестными. Исследовали влияние биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (Chlorophyceae) на биологическую активность, эффективность ризобияльных и цианобактериальных биопрепаратов, а также на микробиом почвы при возделывании фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) сорта «Стрела», а также на общую и удельную урожайность этой культуры. Для почвы из ризосферы растения определяли актуальную азотфиксацию и денитрификацию, эмиссию двуокиси углерода и метана. Таксономическую структуру прокариотного сообщества почвы из ризосферы фасоли определяли методом высокопроизводительного секвенирования ампликонов фрагмента гена 16S рРНК на платформе Illumina. Метагеномные данные анализировали с помощью программных инструментов QIIME и VAMPS. Установили, что использование суспензии клеток *C. vulgaris* IPPAS C-1 в качестве фосфорного биоудобрения не оказывает негативного влияния на биологическую активность почвы, не повышает уровень денитрификации и не вызывает значительного роста эмиссии «парниковых газов». При этом внесение биомассы хлореллы повышало уровень азотфиксации, но не снижало урожайность и не ослабляло действия ростостимулирующих биопрепаратов на основе ризобий и цианобактерий. Также не выявлено значительных изменений таксономического состава прокариот почвы из ризосферы. В целом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии негативного влияния внесения биомассы хлореллы на биологическую активность и микробиом почвы под фасолью. Как следствие, исследование показало принципиальную возможность замены химических удобрений фосфорными биоудобрениями из биомассы микроводорослей.

Ключевые слова: биоудобрения, микробиом, метагеном, микроводоросли, *Chlorella vulgaris*, фосфорное питание

Высокая урожайность в современных технологиях возделывания культурных растений достигается внесением высоких количеств минеральных удобрений, включая фосфорные. Фосфорные удобрения производятся из невозобновляемого минерального сырья, а само производство наносит значительный вред окру-

жающей среде [1]. Существенный недостаток традиционных (химических) удобрений — низкая доступность внесенного с ними фосфора для растений и быстрое вымывание его из почвы. Попадая в водоемы, биодоступный фосфор вызывает эвтрофикацию, «цветение» микроводорослей, в том числе токсичных [2, 3]. Парадигма

безотходной биоэкономики (circular bioeconomy) предписывает переход на использование биоудобрений. Одним из наиболее перспективных видов биоудобрений является обогащенная фосфором биомасса микроводорослей, выращенных на сточных водах [2]. Этот подход обеспечивает, с одной стороны, комплексное решение проблемы эффективной биологической очистки сточных вод, а с другой — экономичное использование невозобновляемых ресурсов фосфора.

Использование биомассы микроводорослей в качестве удобрения обладает целым рядом преимуществ. Скорость освобождения биодоступного фосфора из клеток микроводорослей ближе к скорости его поглощения растениями, что повышает полноту усвоения вносимого фосфора, а также снижает его непродуктивные потери и риск эвтрофикации [4]. Принципиальная возможность использования биомассы микроводорослей как источника фосфора, сравнимого по эффективности с традиционными удобрениями, была показана для культурных растений в защищенном и открытом грунте [4, 5].

Производство пролонгированных химических удобрений, обеспечивающих те же эффекты, обходится дороже получения биомассы микроводорослей. Кроме того, биомасса микроводорослей, в отличие от химических удобрений, не требует заделки в почву, дополнительно снижая затраты труда и иных ресурсов при возделывании культурных растений [3]. Не менее важен положительный эффект, связанный с улучшением структуры почвы и повышением содержания органического углерода после внесения биомассы микроводорослей.

Несмотря на благоприятные перспективы, широкое применение микроводорослей в качестве удобрений сдерживается недостатком фундаментальных знаний о влиянии внесения значительных количеств живых клеток микроводорослей на ключевые характеристики почвы. К важнейшим параметрам относятся биоразнообразие почвенного микробиома и биологическая активность почвы. В настоящей статье представлены результаты анализа влияния предпосевной обработки семян и внесения биомассы зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 под растения фасоли на биологическую активность ризосферной почвы и таксономический состав ее микробиома.

Материалы и методы

Растительные объекты и условия выращивания. Эксперименты проводили на семенах и растениях фасоли (*Phaseolus vulgaris* L., сорт «Стрела»). Для обработки семян использовали

биомассу (суспензию живых клеток плотностью $40 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ по сухому весу в водопроводной воде) одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1, выращенную, как описано ранее [6]. Анализировали влияние предпосевной обработки семян и внесения биомассы *C. vulgaris* на всхожесть, урожайность и биологическую активность почвы. Дополнительно исследовали влияние биопрепаратов «Ризобифит» (препарат на основе клубеньковых бактерий), «Циано-бактериальный консорциум» (ЦБК, состоит из культур цианобактерий *Nostoc* и клубеньковых бактерий) и «Микробный полифункциональный консорциум» (МПК; препарат на основе ризобийных штаммов, культур *Bacillus* sp. и *Lelliotia* sp.), описание приводится на сайте производителя (<https://niishk.ru/innovacionnaya-produkciya/mik/>). Почва — дерново-подзолистая, предшественник — чистый пар без внесения удобрений. Подготовка почвы: ранневесенняя перекопка вручную на глубину 16–20 см, после подсыхания почвы — рыхление почвы на глубину 25–27 см. Посадку фасоли осуществляли 6 мая 2018 г.; высаживали по 100 семян в ряд в каждом из экспериментальных вариантов. При посадке семена обрабатывали суспензией микроводорослей и (или) биопрепарата (сухой вес клеток микроводоросли в суспензии — 2% от массы семян). При посадке также вносили биомассу микроводорослей (содержание фосфора — 6% от сухого веса клеток по измерениям методом ICP-MS [7]) либо (в контроле) суперфосфат в дозе, эквивалентной по содержанию фосфора таковому, внесенному с биомассой микроводорослей ($0,8 \text{ г фосфора} \cdot \text{м}^{-2}$ [8]). После посадки проводили мероприятия по уходу за растениями.

Уборку фасоли осуществляли после пожелтения и подсыхания бобов. Учет вели путем уборки бобов вручную с последующим взвешиванием. Для определения биологической активности почвы использовали образцы свежей почвы из ризосферы, отобранные стерильным инструментом в стерильные контейнеры в фазу полной зрелости, перед уборкой урожая. Отсутствие клубеньков фасоли в образцах почвы контролировали визуально. Контроль — вариант без обработки биопрепаратами. Достоверность различия средних значений оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Для определения актуальной нитрификации (нитрогеназной активности) отбирали навески почвы (5 г) без клубеньков. Образцы почвы помещали в пенициллиновые флаконы, герметично закрывали резиновыми пробками и шприцем вводили 1 мл ацетилена. Флаконы инкубировали в термостате (1 ч при 25°C), после чего шпри-

цем отбирали 1 мл газовой фазы и анализировали на газовом хроматографе «Кристалл-2000» с детектором электронного захвата и набивной колонкой (1 м × 3 мм; Porapak N 80/100). Температуры: колонка — 60 °С, детектор — 160 °С, испаритель — 100 °С; расход газа-носителя (N₂) — 50 мл·мин⁻¹, воздуха — 280 мл·мин⁻¹, водорода — 28 мл·мин⁻¹. Все анализы биоактивности почвы проводили в пятикратной повторности.

Для определения актуальной денитрификации навеску свежей почвы (5 г) помещали в пенициллиновые флаконы. Герметично закрывали резиновыми пробками и в течение 1 мин продували аргоном, вводили 1 мл ацетилена и инкубировали (1 ч при 25 °С). Измерение концентрации N₂O проводили на третьи-пятые сутки на газовом хроматографе «Кристалл-2000» с теми же детектором и колонкой. Температуры: колонка — 50 °С, детектор — 240 °С, испаритель — 100 °С; расход газа-носителя — 90 мл·мин⁻¹.

Для определения актуальной эмиссии CO₂ навеску свежей почвы (5 г) помещали в пенициллиновые флаконы, герметично закрывали резиновыми пробками и инкубировали (24 ч при 25 °С). Продукцию CO₂ определяли на газовом хроматографе М-3700 с детектором по теплопроводности и набивной колонкой (3 м × 3 мм), наполнитель — Полисорб-1; температуры: испаритель — 30 °С, детектор — 100 °С; измерительные элементы — 150 °С; сила тока 148 мА, расход газа-носителя (гелия) — 30 мл·мин⁻¹.

Для определения эмиссии метана навески почвы (5 г), просеянной через сито (ячейки 1 мм), помещали в пенициллиновые флаконы, увлажняли стерильной водой до влажности 60% от полной влагоемкости. Флаконы укупоривали резиновой пробкой и помещали в термостат при температуре 25 °С на 7 сут. Затем из флаконов отбирали пробу (1 мл) и на хроматографе «Кристалл-2000» с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) определяли количество образовавшегося метана.

ДНК для метагеномного анализа выделяли из навески свежей стерильно отобранной почвы массой 0,25 г с помощью набора реактивов PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., США) по протоколу производителя. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК с гипервариабельным участком V4 и приготовление библиотек для секвенирования осуществляли, как описано ранее [9] с использованием олигонуклеотидных праймеров F515 (5'-gtgccagcmgcccggtaa-3') и R806 (5'-ggactacvsgggtatcta-3') [10]. Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реактивов MiSeq 500

cycles v. 2 kit (part number MS-102-2003, Illumina, США) для парного-концевого чтения (2 × 250 п.н.).

Первичную обработку данных (сортировку ампликонов, оценку качества полученных последовательностей, а также удаление химерных последовательностей и последовательностей неудовлетворительного качества) осуществляли в программе QIIME v 1.9.1 [11]. В рассмотрение принимались лишь последовательности с длиной 200–500 нуклеотидов. Дальнейшую обработку данных, а именно оценку таксономического состава и β-разнообразия (сравнение образцов между собой), проводили при помощи онлайн-сервиса VAMPS [12]. В качестве базы референсных последовательностей использовали базу данных Silva, версия 119 от 24.07.2014 [13]. Для сравнения прокариотических сообществ для каждой пары образцов на основании принадлежности последовательностей к различным родам бактерий и архей рассчитывали индекс сходства Мориситы-Хорна [14]. Элементы полученной матрицы сходства использовали для анализа методом главных компонент (три компоненты).

Результаты и обсуждение

Сопоставление урожайности фасоли сорта «Стрела» в проведенных экспериментах выявило значительную прибавку в общей урожайности (785,5±30 г против 341±25 г в контроле), главным образом за счет 2–3-кратного повышения всхожести семян. Достоверных различий по удельной урожайности (в расчете на одно растение) выявлено не было. Внесение биомассы хлореллы и биопрепарата МПК давало дополнительное повышение общей урожайности (924±45 г) по сравнению с обработкой только биомассой хлореллы. Обработка семян только исследованными биопрепаратами без внесения биомассы микроводорослей (см. раздел «Материалы и методы») не оказывала влияния на всхожесть и урожайность, сравнимого с таковым при внесении биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1. Таким образом, замена традиционных (химических) фосфорных удобрений биомассой хлореллы при эквивалентных дозах внесения (0,8 г Р/м²) в наших экспериментальных условиях не вызывала снижения урожайности в расчете на одно растение, а общая урожайность повышалась на 30% (в варианте с дополнительной обработкой семян биопрепаратом МПК — на 70%).

Возможность применения удобрений и биопрепаратов, а также их эффективность определяется не только повышением урожайности, но и влиянием вносимых удобрений на свойства почвы, в частности, на ее микробиологическую

активность. В этой связи было исследовано влияние внесения биомассы хлореллы и обработки биопрепаратами МПК, ЦБК и «Ризобифит» на ключевые параметры микробиологической активности почвы. Важной характеристикой состояния почвы является активность азотфиксирующих микроорганизмов, повышающих содержание биодоступного химически связанного азота. Установлено, что внесение биомассы хлореллы стимулирует актуальную азотфиксацию в почве под фасолью в фазе цветения фасоли; в момент уборки урожая, а также в других экспериментальных вариантах такого эффекта не обнаружено (рис. 1А).

В отличие от азотфиксации, процессы дени-

трификации вызывают потерю биодоступного азота из почвы, что нежелательно с точки зрения обеспечения растений азотом. Как видно из рис. 1Б, внесение биомассы хлореллы вызвало снижение актуальной денитрификации почвы при возделывании фасоли, в том числе в сочетании с биопрепаратом МПК (биопрепарат ЦБК вызывал такой эффект сам по себе). Положительное влияние внесения биомассы хлореллы проявлялось и в фазе цветения, и в фазе уборки урожая. Внесение биомассы хлореллы способствует сохранению, а в ряде случаев — и росту фонда биодоступного азота в почве.

В связи с усилением парникового эффекта и вызванными им глобальными изменениями кли-

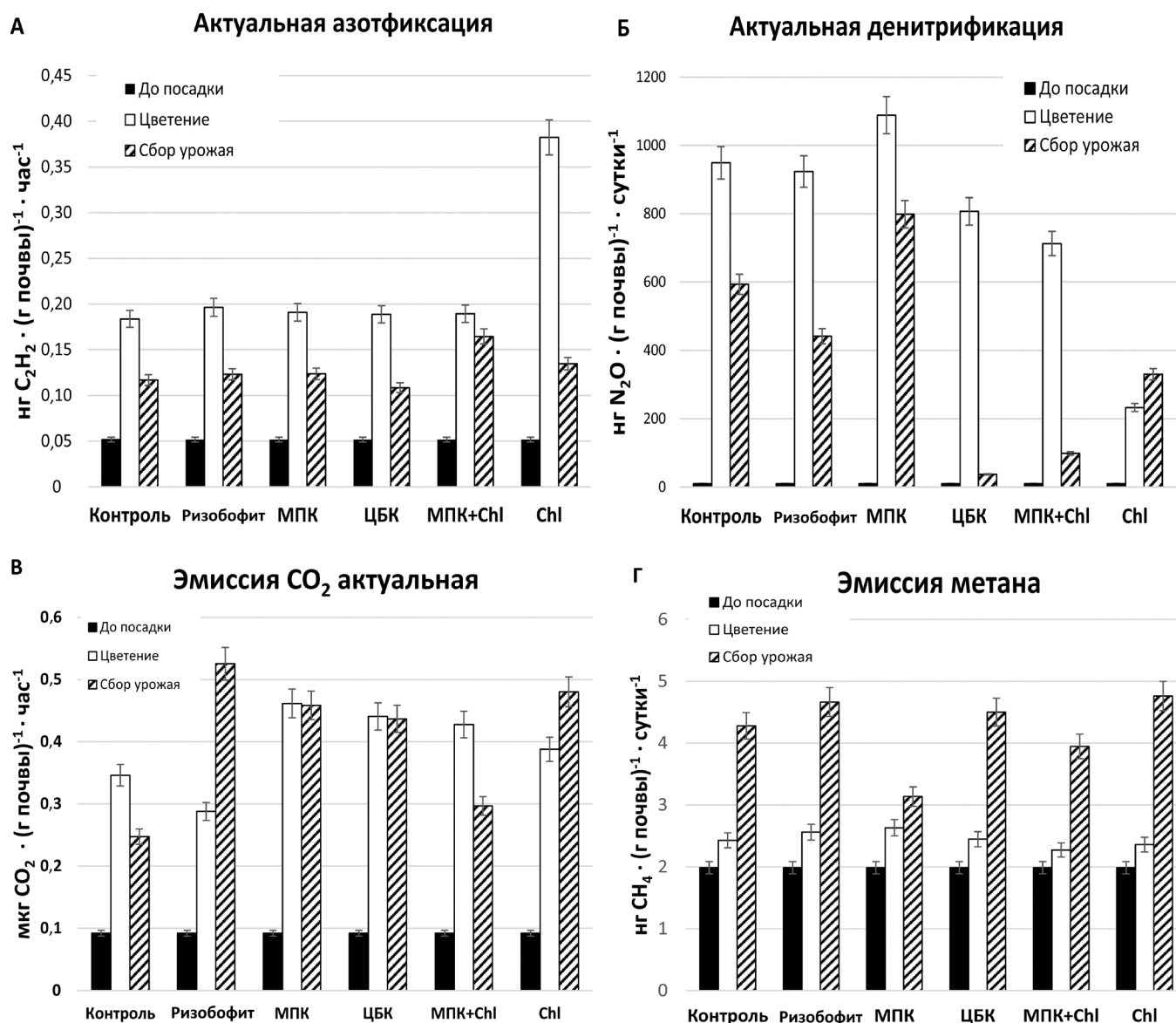


Рис. 1. Влияние обработки семян биопрепаратами из биомассы бактерий и микроводорослей на биологическую активность почвы. А — азотфиксация, Б — эмиссия метана, В — денитрификация и Г — эмиссия CO₂ в почве под фасолью сорта «Стрела» в различные фазы вегетационного цикла. Контроль — необработанные семена; «Ризобифит», МПК, ЦБК — ризобийно-цианобактериальные биопрепараты; Chl — биомасса микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1, обогащенная фосфором (подробное описание в разделе «Материалы и методы»).

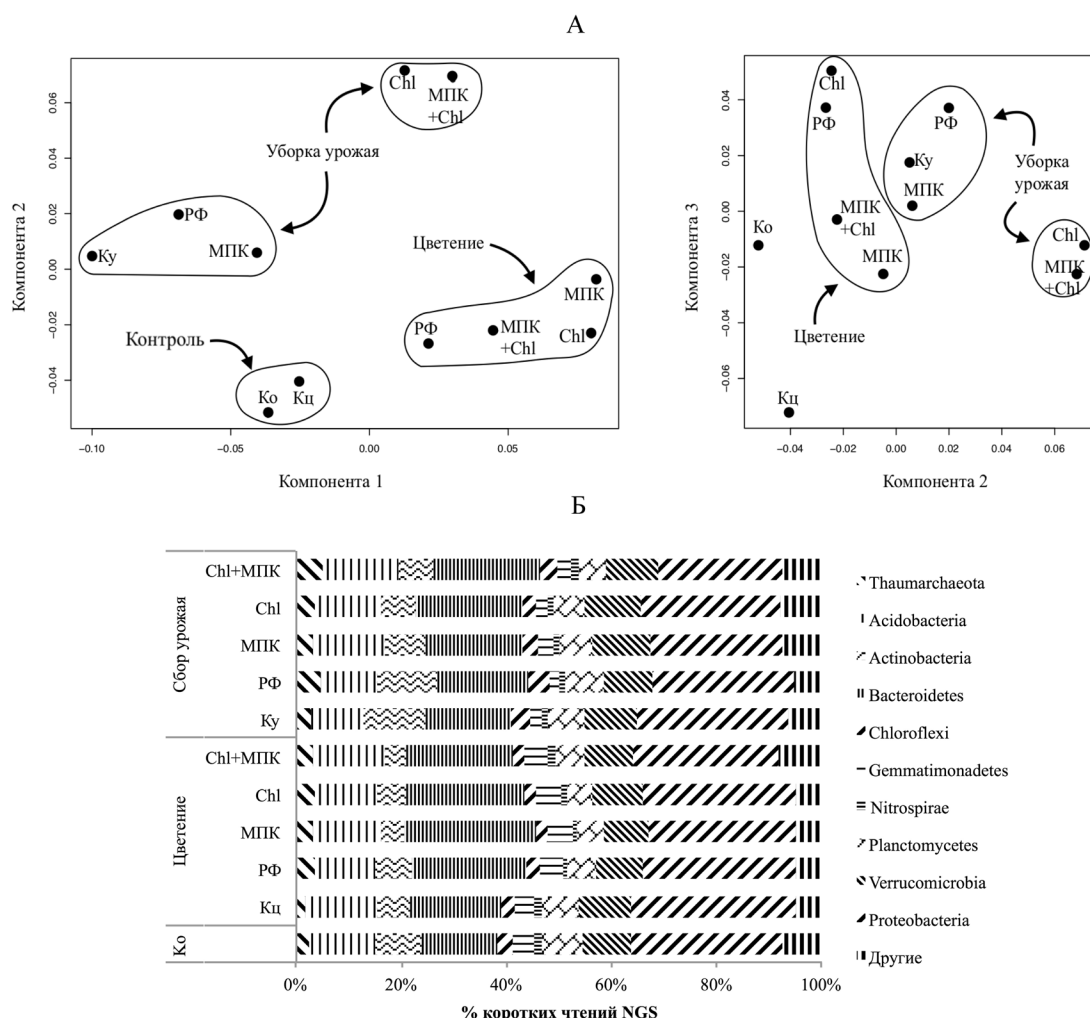


Рис. 2. β - и α -разнообразие почвенного микробиома: сравнение таксономического состава методом главных компонент по значениям индекса Мориситы-Хорна (А) и таксономический состав образцов на уровне филума, исследованный методом высокопроизводительного секвенирования библиотек фрагмента гена 16S рРНК (Б). Ко — общий контроль почвы для двух фаз (почва перед посевом), Кц — контроль в фазу цветения фасоли, Ку — контроль в период уборки урожая.

мата значительное внимание привлекает эмиссия «парниковых газов», таких как метан и двуокись углерода, из почв [15]. Оценка вклада этого процесса в наблюдаемые изменения климата вызывает оживленные дебаты, однако снижение эмиссии «парниковых газов» (или хотя бы сохранение ее на текущем уровне) считается одной из важных целей. В наших экспериментах внесение биомассы хлореллы вызывало некоторое увеличение актуальной эмиссии CO_2 по сравнению с контролем только в фазе уборки урожая; в других экспериментальных вариантах зарегистрирован сходный по величине эффект (рис. 1В). Влияние исследованных биопрепаратов на эмиссию метана из почвы под фасолью в фазе цветения было незначительным, но во всех экспериментальных вариантах к началу фазы уборки урожая эмиссия метана значительно увеличивалась (рис. 1Г). При этом эмиссия метана при обработке

биопрепаратами, а также при внесении биомассы хлореллы не отличалась достоверно от контроля (кроме варианта с обработкой биопрепаратом МПК, вызывавшей снижение эмиссии метана в фазе уборки урожая). Таким образом, внесение биомассы хлореллы, как и любое дополнительное внесение органического углерода, может повышать эмиссию CO_2 . При этом достоверного повышения эмиссии метана — газа, более эффективно усиливающего парниковый эффект, не наблюдали.

Важной характеристикой почвы является таксономическая структура населяющих ее микроорганизмов. При-

нимать решение о возможности использования тех или иных удобрений необходимо с учетом их влияния на биоразнообразие почвенных микроорганизмов. В этой связи оценивали влияние внесения биомассы хлореллы и иных вариантов обработки на таксономический состав почвенных бактерий. Эту задачу решали методом метагеномного анализа (см. Материалы и методы).

На основании рассчитанных значений индекса сходства Мориситы-Хорна сделан вывод о том, что состав прокариотических сообществ почвы в ризосфере растения в большей степени определялся стадией культивирования, чем типом обработки (рис. 2А). В целом, для образцов ризосферной почвы было характерно преобладание следующих филумов бактерий: Acidobacteria (10,17–14,89% от общего числа чтений в наборе данных), Bacteroidetes (14,56–25,28%), Proteobacteria (26,01–31,39%) и

Verrucomicrobia (8,57–11,19%) (рис. 2Б). В ряде проб наблюдалась высокая частота встречаемости (до 12,12% от общего числа чтений) последовательностей Actinobacteria. Представители филума Planctomycetes были отмечены в несколько меньшем количестве (5,04–7,72% от общего числа чтений). Также все образцы характеризовались высокой частотой встречаемости архей филума Thaumarchaeota (до 5,25% от общего числа чтений). Существенное значение имеет тот факт, что обилие представителей филумов Actinobacteria, Planctomycetes и Proteobacteria, в частности, Gammaproteobacteria, в почве является важным показателем ее продуктивности [16]. Значительных качественных различий в таксономическом составе образцов ризосферы почвы выявлено не было: почти все обнаруженные группы прокариот присутствовали в каждом исследованном образце. Однако для ряда таксонов наблюдались существенные различия в частоте встречаемости относящихся к ним последовательностей 16S рРНК (рис. 3).

В частности, увеличивалась частота встречаемости в наборе метагеномных данных последовательностей некоторых родов бактерий в период цветения: *Massilia*, *Peredibacter*, *Adhaeribacter*, *Gemmatimonas*, *Flavisolibacter* и *Sphingomonas*. Известно, что бактерии рода *Massilia* являются доминантными обитателями ризосферы некоторых растений [17], а представители Bacteroidetes (куда относятся *Adhaeribacter*, *Flavisolibacter*), так же как Sphingomonadaceae (*Sphingomonas*), отмечены в ризосфере фасоли [18]. Помимо этого, существуют данные о присутствии в ряде случаев почвенной бактерии *Peredibacter* в эндосфере растений [19]. Представители Gemmatimonadates (*Gemmatimonas*) отмечались как в свободной почве, так и в прикорневой растительной зоне [20]. Повышение доли последовательностей всех вышеперечисленных родов бактерий наблюдалось при внесении удобрений.

В случае с представителями Euryarchaeota наблюдалось значительное увеличение относительного содержания соответствующих им последовательностей в почве при добавлении биомассы микроводоросли *C. vulgaris* IPPAS C-1 в период цветения. В фазу уборки урожая представленность данной группы при добавлении биомассы микроводоросли соответствовала вариантам почвы с применением МПК или МПК+ *C. vulgaris* IPPAS C-1. Использование биомассы клеток фототрофного микроорганизма по сравнению с удобрением МПК увеличивало количество последовательностей группы Fibrobacteraceae в фазу цветения, а в период сбора урожая эффект был противоположный. Для почвы с комбинированным применением МПК и биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1 было отмечено значительное увеличение относительного количества чтений, соответствующих группе Euryarchaeota.

Наиболее существенное влияние добавления биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1, в отличие от всех других вариантов, наблюдалось для последовательностей *Rhizobium* (Proteobacteria, Rhizobiaceae) в фазу уборки урожая (рис. 3). Известно, что между бобовыми растениями и бактериями сем. Rhizobiaceae формируются симбиотические взаимоотношения, а инокуляция бобовых культур данными бактериями приводит к повышению урожайности вследствие симбиотической азотфиксации [21, 22]. Количество последовательностей, соответствующих бактерии рода *Steroidobacter* (ее распространение связывают с увеличением антропогенного загрязнения почвы [23]), наблюдалось только при добавлении препарата «Ризобифит». Эксперимент также сопровождался повышением частоты встречаемости последовательностей бактерии рода *Methylobacter*. Эти бактерии способны утилизировать широкий спектр углеродных субстратов, включая карбоновые кислоты, спирты, ароматические соединения, а также соединения, содержащие метильные группы [24]. Рост их обилия может быть связан с обогащением почвы органическим углеродом в результате как внесения биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1, так и экскреции растениями вторичных метаболитов.

В целом стоит отметить, что микробиом почвы в случае применения биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1 как биоудобрения был схож с вариантом использования МПК (как отдельного удобрения, так и совместно с биомассой микроводоросли). Данный факт, как и ранее опубликованные данные [4, 5], подтверждает безопасность использования биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1, поскольку внесение водорослей изменяло микробиом почвы не более чем внесение традиционных химических удобрений.

В заключение следует отметить, что использование биомассы *C. vulgaris* IPPAS C-1 в качестве фосфорного биоудобрения не оказывало в наших экспериментальных условиях негативного влияния на биоразнообразие прокариот и биологическую активность ризосферной почвы. Существенно, что при этом повышалась денитрификация и не увеличивалась эмиссия «парниковых газов». Использование биомассы хлореллы не ослабляло действия ростостимулирующих биопрепаратов на основе ризобий и цианобактерий и наоборот, (циано)бактериальные биопрепараты не снижали эффект от использования биомассы хлореллы. Сказанное выше

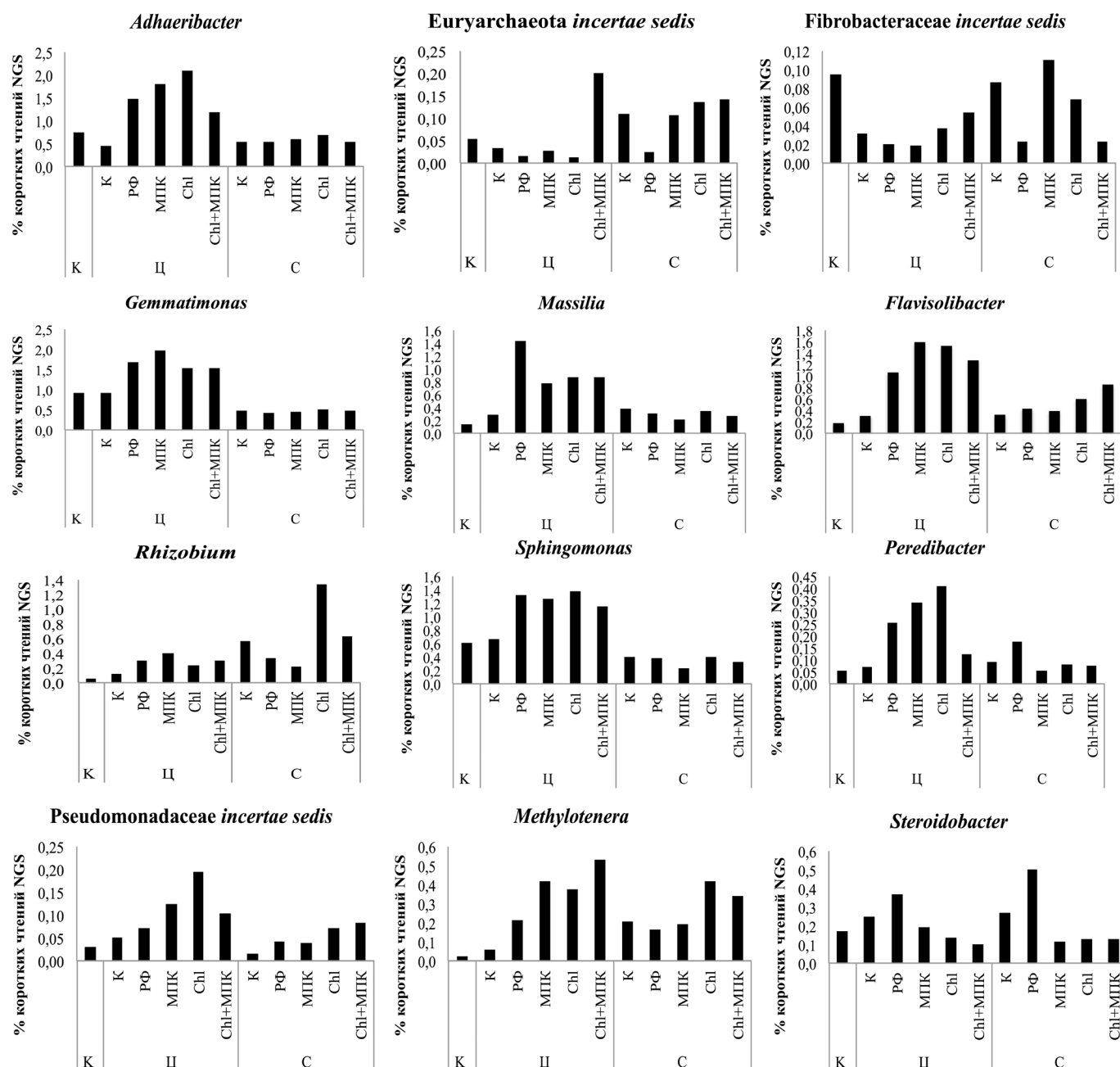


Рис. 3. Сравнение представленности отдельных групп бактерий из микробиома почвы на основе относительного количества последовательностей фрагмента гена 16S рРНК соответствующих таксономических групп.

подтверждает принципиальную возможность замены (по крайней мере, частичной) химических удобрений фосфорными биоудобрениями из биомассы микроводорослей при возделывании фасоли. Проверка применимости биомассы микроводорослей при возделывании других культур потребует дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность к.б.н. в.н.с. кафедры биоинженерии биологического факуль-

тета МГУ К.А. Чеканову за помощь в обработке метагеномных данных и написании статьи. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение № 14.616.21.0080/RFMEFI61617X0080).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Daneshgar S., Callegari A., Capodaglio A., Vaccari D. The potential phosphorus crisis: resource

conservation and possible escape technologies: a review // *Resources*. 2018. Vol. 7. N 2: 37.

2. *Melia P.M., Cundy A.B., Sohi S.P., Hooda P.S., Busquets R.* Trends in the recovery of phosphorus in bioavailable forms from wastewater // *Chemosphere*. 2017. Vol. 186. P. 381–395.

3. *Solovchenko A., Verschoor A.M., Jablonowski N.D., Nedbal L.* Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae // *Biotechnol. Adv.* 2016. Vol. 34. N 5. P. 550–564.

4. *Mulbry W., Westhead E.K., Pizarro C., Sikora L.* Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer // *Bioresource Technol.* 2005. Vol. 96. N 4. P. 451–458.

5. *Schreiber C., Schiedung H., Harrison L. et al.* Evaluating potential of green alga *Chlorella vulgaris* to accumulate phosphorus and to fertilize nutrient-poor soil substrates for crop plants // *J. Appl. Phycol.* 2018. Vol. 30. N 5. P. 2827–2836.

6. *Kuznetsov A.G., Pogosyan S.I., Konyukhov I.V., Vasilieva S.G., Lukyanov A.A., Zotov V.S., Nedbal L., Solovchenko A.E.* Possibilities of optical monitoring of phosphorus starvation in suspensions of microalga *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (Chlorophyceae) // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N. 3. P. 118–123.

7. *Solovchenko A., Khozin-Goldberg I., Selyakh I. et al.* Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited // *Algal Res.* 2019. Vol. 43: 101651.

8. Дерюгин И.П., Кулюкин А.Н. Питание и удобрение овощных культур. М.: Изд-во МСХА, 1998. 326 с.

9. *Kublanovskaya A., Chekanov K., Solovchenko A., Lobakova E.* Cyanobacterial diversity in the algal–bacterial consortia from Subarctic regions: new insights from the rock baths at White Sea Coast // *Hydrobiologia*. 2019. Vol. 830. N 1. P. 17–31.

10. *Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N.* Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // *ISME J.* 2011. Vol. 5. P. 908–916.

11. *Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Methods*. 2010. Vol. 7. P. 335–336.

12. *Huse S.M., Welch D.B.M., Voorhis A., Shipunova A., Morrison H.G., Eren A.M., Sogin M.L.* VAMPS: a website for visualization and analysis of microbial population structures // *BMC Bioinformatics*. 2014. Vol. 15: 41.

13. *Yilmaz P., Parfrey L.W., Yarza P., Gerken J., Pruesse E., Quast C., Schweer T., Peplies J., Ludwig W., Glöckner F.O.* The SILVA and «all-species living tree project (LTP)» taxonomic frameworks // *Nucleic*

Acids Res. 2013. Vol. 42. N D1. P. D643–D648.

14. *Horn H.S.* Measurement of «overlap» in comparative ecological studies // *Am. Nat.* 1966. Vol. 100. N 914. P. 419–424.

15. *Smith K.A., Ball T., Conen F., Dobbie K.E., Massheder J., Rey A.* Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes // *Eur. J. Soil Sci.* 2003. Vol. 54. N 4. P. 779–791.

16. *Chang H.X., Haudenshield J.S., Bowen C.R., Hartman G.L.* Metagenome-wide association study and machine learning prediction of bulk soil microbiome and crop productivity // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8: 519.

17. *Ofek M., Hadar Y., Minz D.* Ecology of root colonizing Massilia (Oxalobacteraceae) // *PloS One*. 2012. Vol. 7. N 7: e40117.

18. *Pérez-Jaramillo J.E., Carriyn V.J., Bosse M., Ferrero L.F., de Hollander M., Garcia A.A., Ramírez C.A., Mendes R., Raaijmakers J.M.* Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits // *ISME J.* 2017. Vol. 11. N 10. P. 2244–2257.

19. *Campisano A., Albanese D., Yousaf S., Pancher M., Donati C., Pertot I.* Temperature drives the assembly of endophytic communities' seasonal succession // *Environ. Microbiol.* 2017. Vol. 19. N 8. P. 3353–3364.

20. *Novello G., Gamalero E., Bona E., Boatti L., Mignone F., Massa N., Cesaro P., Lingua G., Berta G.* The rhizosphere bacterial microbiota of *Vitis vinifera* cv. pinot noir in an integrated pest management vineyard // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8: 1528.

21. Beck D.P., Materon L.A., Afandi F. Practical Rhizobium-legume technology manual. Technical manual No. 19. Aleppo: ICARDA, 1993. 389 pp.

22. Мишустин Е.Н. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М.: Наука, 1973. 149 с.

23. *Fahrbach M., Kuever J., Remesch M., Huber B.E., Kämpfer P., Dott W., Hollender J.* *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 2008. Vol. 58. N 9. P. 2215–2223.

24. *Kalyuzhnaya M.G., Beck D.A., Suci D., Pozhitkov A., Lidstrom M.E., Chistoserdova L.* Functioning *in situ*: gene expression in *Methylobacterium mobilis* in its native environment as assessed through transcriptomics // *ISME J.* 2010. Vol. 4. N 3. P. 388–398.

Поступила в редакцию 10.07.2019 г.

После доработки 19.09.2019 г.

Принята в печать 05.10.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

THE EFFECT OF THE MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* IPPAS C-1 (CHLOROPHYCEAE) BIOMASS APPLICATION ON YIELD, BIOLOGICAL ACTIVITY, AND THE MICROBIOME OF THE SOIL DURING BEAN GROWIN

A.A. Kublanovskaya¹, S.A. Khapchaeva², V.S. Zotov², P.A. Zaytsev¹, E.S. Lobakova¹,
A.E. Solovchenko^{1,*}

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

²Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» RAS, Leninsky Prospekt 33–2, Moscow,
119071, Russia

*e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

The current problem with phosphorus fertilizers are shortage of rock phosphate from which it is produced and adverse impact of their production and use on the environment. A promising solution is use of phosphorus-rich biomass of microalgae as biofertilizer, but possible impact of such fertilizers on the biological activity and microbiome of soils remain unknown in many aspects. We investigated the effect of *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 biomass application on yield, biological activity, efficacy of the rhizobia- and cyanobacteria-based growth promoting formulations, as well as the microbiome of the soil during cultivation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cvr. «Strela». Total and specific yield, actual nitrification and denitrification, carbon dioxide and methane emission were determined for soil samples from the rhizosphere. The taxonomic structure of the prokaryotic community of the bean rhizosphere was determined by NGS of 16S rRNA gene amplicons on the Illumina platform. The metagenomic data were analyzed using software tools QIIME and VAMPS. It was found that the application of biomass of *C. vulgaris* IPPAS C-1 as a phosphorus biofertilizer increased the bulk yield of beans. It also allowed to achieve the specific yield (per plant) level provided by traditional fertilizers. The biomass application did not (i) impact the biological activity of the soil, (ii) did not increase the level of denitrification, and (iii) did not increase significantly the soil emission of the «greenhouse gases». The *Chlorella* biomass application hamper the growth-promoting effect of the bacterial preparations made from rhizobia and cyanobacteria. Also, no significant changes in the taxonomic composition of the soil of the rhizosphere microbiome upon the application of the *Chlorella* biomass were revealed. Collectively, the results indicate the possibility of at least partial replacement of chemical fertilizers with phosphorus biofertilizers from microalgae biomass in the field growing of beans.

Keywords: *biofertilizer, microbiome, metagenome, microalgae, Chlorella vulgaris, phosphorus nutrition*

Сведения об авторах

Кублановская Анна Андреевна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: shanina.anna.andr@yandex.ru

Хапчаева Софья Арсеновна — мл. науч. сотр. группы альгобиотехнологии Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Биотехнологии РАН». Тел.: 8-495-952-33-09; e-mail: sakhapchaeva.1990@gmail.com

Зотов Василий Сергеевич — канд. биол. наук, руководитель группы Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Биотехнологии РАН». Тел.: 8-495-952-33-09; e-mail: algo.consortium@gmail.com

Зайцев Петр Андреевич — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: petr_zaitcev@yandex.ru

Лобакова Елена Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: elena.lobakova@gmail.com

Соловченко Алексей Евгеньевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 576.08

**ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО ПРОТОКОЛА ПОЛУЧЕНИЯ
ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ
ЧЕЛОВЕКА****Д.К. Матвеева¹, Е.Р. Андреева^{1, *}, Л.Б. Буравкова^{1, 2}**¹*Институт медико-биологических проблем РАН, Россия, 123007, г. Москва,
Хорошевское ш., д.76А;*²*Кафедра экологической и экстремальной медицины, факультет фундаментальной медицины,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва,
Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: andreeva1564@gmail.com*

В современных исследованиях для нужд регенеративной медицины активно изучаются биологические скаффолды, состоящие из внеклеточного матрикса (ВКМ). Подложки из ВКМ получают путем децеллюляризации и используют для доставки клеток в участки поврежденных тканей. Нативные препараты ВКМ имеют преимущества перед биоинженерными конструкциями, поскольку сохраняют биологические сигналы, обеспечивающие эффективные репаративные функции клеток. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) обладают мультипотентным потенциалом дифференцировки, а также секретируют широкий спектр биологически активных молекул. В связи с этим МСК являются важными посредниками для восстановления тканей. ВКМ как компоненты МСК модулирует их функциональную активность, в том числе миграцию, пролиферацию и дифференцировку, а также поддерживает их потенцию к самообновлению. Исследования *in vitro* позволяют продвинуться в понимании того, как биологические скаффолды могут влиять на репаративные функции МСК. Существует несколько различных протоколов децеллюляризации. В связи с тем, что ВКМ клеток различных типов отличается по качественным и количественным параметрам, эти протоколы должны быть оптимизированы в каждом конкретном случае. В настоящем исследовании при получении децеллюляризованных препаратов ВКМ (дцВКМ) МСК из жировой ткани человека (жтМСК) сравнивали эффективность гипотонического и изотонического вариантов подхода с использованием Triton X-100 в комбинации с NH_4OH , а также возможность использования дцВКМ после формирования сфероидов. Полученные препараты оценивали качественно с помощью иммуоцитохимии и сканирующей электронной микроскопии. жтМСК при длительном культивировании продуцировали хорошо развитый ВКМ, который после децеллюляризации с помощью изотонического раствора Triton X-100/ NH_4OH сохранял структуру, близкую к нативной. При использовании водного раствора Triton X-100/ NH_4OH не удалось получить однородного слоя дцВКМ, на сканирующей электронной микроскопии были выявлены единичные волокна ВКМ. При сборке клеточных сфероидов под действием RGD-пептидов, на подложке были обнаружены фрагменты матрикса и клеток, что не позволило признать этот метод эффективным для получения дцВКМ жтМСК.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки человека, внеклеточный матрикс, децеллюляризация, регенеративная медицина, иммуоцитохимия, сканирующая электронная микроскопия

МСК в настоящее время широко изучаются как перспективный источник клеток для регенеративной медицины и клеточной терапии, поскольку обладают высокой пролиферативной

активностью, мультилинейным потенциалом дифференцировки и продуцируют широкий спектр биологически активных молекул [1]. *In vivo* стволовые/стромальные клетки локализуются

в специфических нишах, образованных различными клеточными и неклеточными компонентами [2, 3]. Одним из важных факторов микроокружения МСК является ВКМ. Молекулы матрикса прямо или опосредованно вовлечены в регуляцию физиологической и репаративной активности клеток. Жесткость, топография, пористость, нерастворимость могут модулировать свойства клеток, связанные с адгезией, миграцией, пролиферацией и полярностью [4]. Взаимодействие МСК с ВКМ имеет двунаправленный характер. Клетки в ответ на сигналы из микроокружения ремоделируют ВКМ за счет активности соответствующих ферментов [5].

Отдельные компоненты ВКМ активно применяются в лабораторной и клинической практике, однако это не позволяет полностью воссоздать клеточное микроокружение [6]. Децеллюляризованный ВКМ (дцВКМ) нативных тканей или культивируемых клеток широко внедряется в регенеративную медицину, как источник биологических скаффолдов для реконструкции тканей [7]. Главной целью децеллюляризации является удаление клеточных антигенов и других иммуногенных компонентов, таких как ДНК, чтобы минимизировать риск неблагоприятных иммунологических реакций. Решение этой задачи должно быть сбалансировано с сохранением целостности, состава и биоактивности полученного дцВКМ. По сравнению

с использованием биоинженерных скаффолдов, применение естественного ВКМ, полученного при удалении клеток, предполагает, помимо биосовместимости, сохранение архитектуры и биохимических свойств ткани, что может быть критичным для поддержания жизнеспособности клеток и их участия в физиологическом и репаративном ремоделировании [8].

Исследования *in vitro* позволяют оценить вклад отдельных типов клеток в продукцию и ремоделирование матрикса. МСК, как ключевые компоненты соединительной ткани, при культивировании синтезируют достаточное количество ВКМ с различными фибриллярными и растворимыми структурными элементами [9]. Удаление клеток различными агентами позволяет сохранить каркас из матрикса, в котором, как правило, преобладают фибриллярные компоненты, а также сохраняется толщина и механические свойства, характерные для нативного состояния [10].

Существуют различные варианты методов децеллюляризации с помощью физических, химических и биологических воздействий: циклы замораживания-размораживания, использование протеаз и нуклеаз, ультразвуковое воздействие, детергентная или кислотная экстракция клеток [10].

Целью нашей работы были подбор оптимального протокола для получения дцВКМ жтМСК

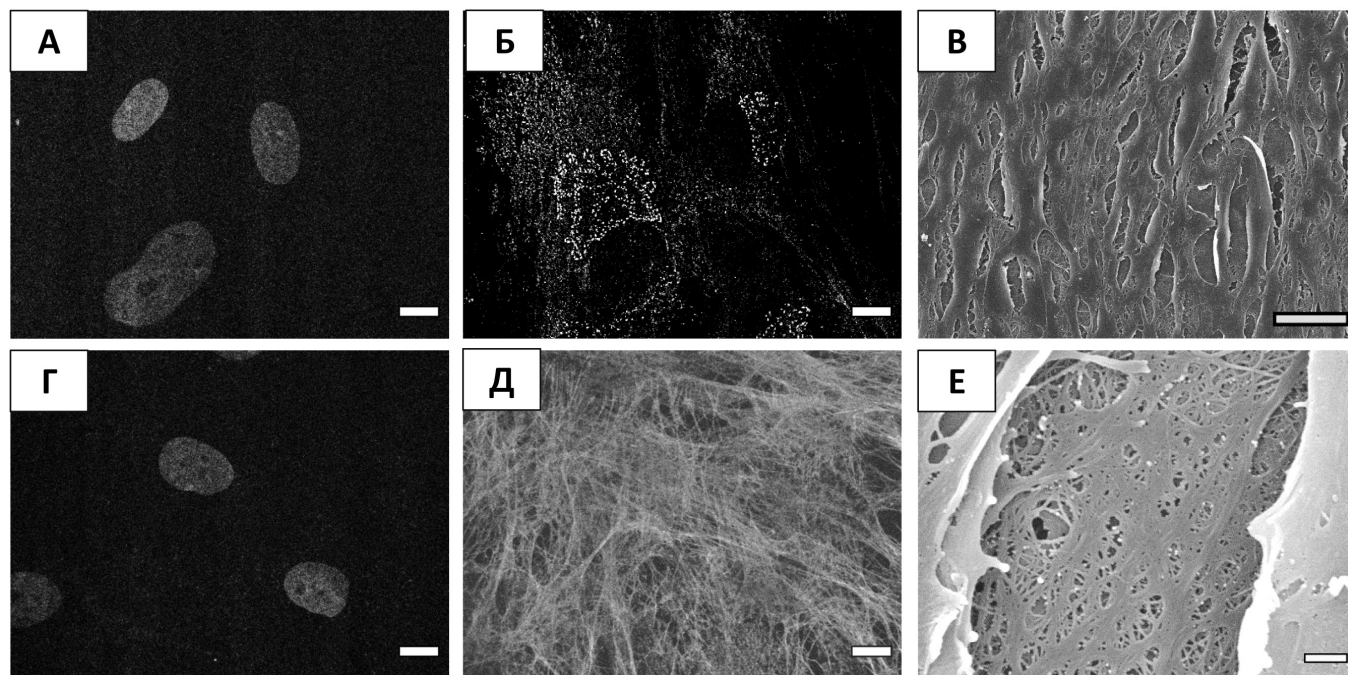


Рис. 1. Характеристика ВКМ, продуцируемого жтМСК в течение 14 сут. А, Б — иммуноцитохимическое выявление коллагена типа I; Г, Д — иммуноцитохимическое выявление фибронектина. А, Г — выявление нуклеиновых кислот с помощью красителя DAPI; Б, Д — антигены, меченные FITC. Конфокальная микроскопия LSM 780 Carl Zeiss. В, Е — сканирующая электронная микроскопия (CamScanZ2). В — монослой жтМСК; Е — ВКМ в промежутках между клетками. Масштабный отрезок 20 мкм (А, Б, Г, Д), 50 мкм (В), 1 мкм (Е).

и морфологическая характеристика полученного дцВКМ.

Материалы и методы

Культивирование клеток. жтМСК из стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека культивировали в среде α -MEM (Gibco, Великобритания) с добавлением пенициллина/стрептомицина (100 ед/мл и 100 мг/мл соответственно, ПанЭко, Россия) и эмбриональной телячьей сыворотки (10% об./об.; HyClone, США) в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 , 95% воздуха; Sanyo, Япония). Полученные клетки проверяли на соответствие критериям жтМСК: способность к остеогенной и адипогенной дифференциров-

50 мкг/мл (Fluka, Германия).

Методы децеллюляризации. Культивируемые жтМСК, полученные по методике, описанной выше, трижды промывали 20 mM фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (ПанЭко, Россия) от остатков среды и готовили препараты дцВКМ, используя следующие подходы:

1) гипоосмотический протокол — жтМСК обрабатывали гипоосмотическим водным раствором 0,2% Triton X-100 (Fergas, Германия) 5 мин при комнатной температуре и далее 0,3% NH_4OH (Реахим, Россия) при комнатной температуре в течение 15 мин [11].

2) изоосмотический протокол — использовали изоосмотический раствор 0,5% Triton X-100

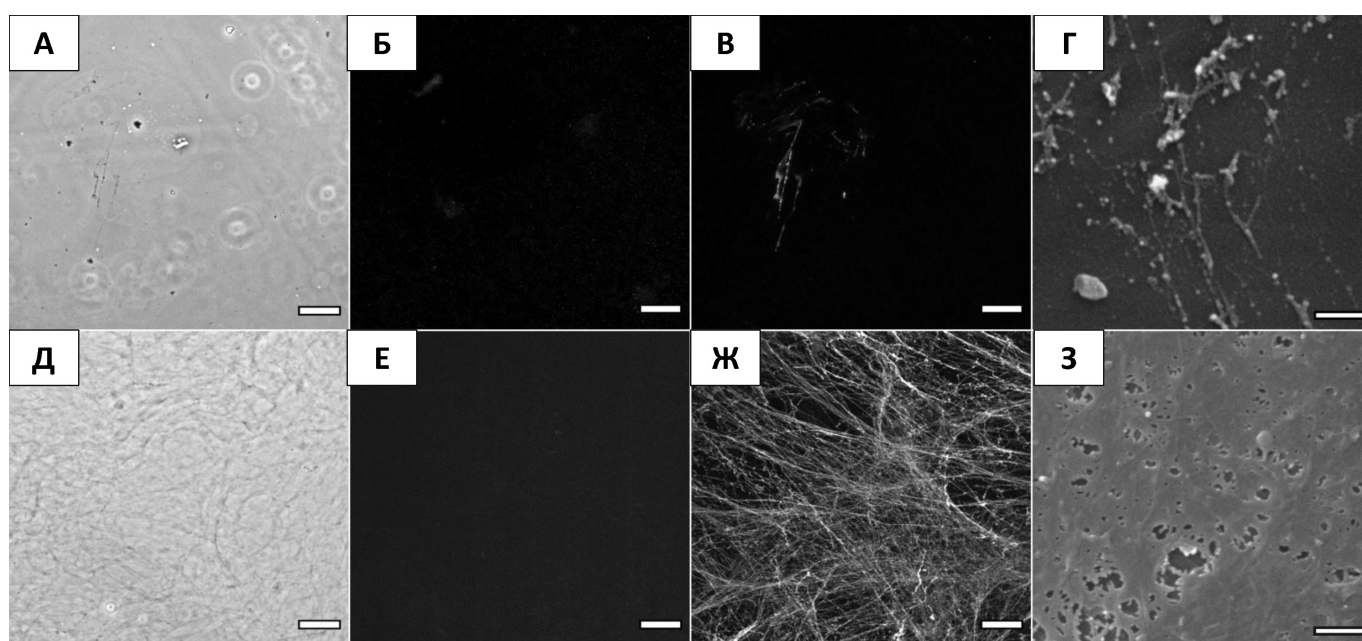


Рис. 2. Получение дцВКМ жтМСК с помощью Triton X-100 в сочетании с NH_4OH : А–Г — 0,2% Triton X-100 и 0,3% NH_4OH ; Д–З — 0,5% Triton X-100 в ФСБ, содержащий 20 mM NH_4OH . А, Д — дцВКМ жтМСК; Б, Е — выявление ДНК-контаминации с помощью красителя DAPI; В, Ж — иммуноцитохимическое выявление фибронектина на препаратах дцВКМ (FITC); А–В, Д — Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония); Е, Ж — конфокальная микроскопия LSM 780 Carl Zeiss; Г, З — визуализация дцВКМ с помощью сканирующей электронной микроскопии (CamScanZ2). Масштабный отрезок 20 мкм (А–Ж), 1 мкм (Г, З).

ке, экспрессию маркеров стромальных клеток CD73, CD90, CD105 и отсутствие экспрессии маркера гемопоэтических клеток CD45 (данные не представлены). Плотность посадки составляла 3–3,5 тыс. клеток/см². Среду обновляли каждые 3–4 сут. В экспериментах использовали клетки 3–5 пассажей. Для анализа продукции ВКМ жтМСК рассеивали на культуральный пластик или покровные стекла в высокой плотности (7,5 тыс. клеток/см²) и культивировали в течение 14 сут. Для стимуляции продукции компонентов матрикса к клеткам в предмонослойном состоянии в среду культивирования добавляли 2-фосфо-L-аскорбат натрия в концентрации

в ФСБ (pH=7,2), содержащий 20 mM NH_4OH при 37 °C в течение 5 мин [12]. Лизис клеток в обоих случаях отслеживали с помощью фазово-контрастной микроскопии (рис. 2А, Д).

3) RGD-протокол — для получения препаратов дцВКМ использовали метод, который применяют для получения клеточных сфероидов с помощью пептида, содержащего RGD-домен (Arg-Gly-Asp) — цикло-RGDfK (TPP) (RGD-пептид) (по протоколу [13]). После 14 сут культивирования питательную среду заменяли средой, содержащей 80 mM RGD-пептида. После формирования сфероидов (в течение 3–4 сут), их аккуратно удаляли пипеткой.

После децеллюляризации препараты промывали ФСБ и использовали для анализа, как описано ниже.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Образцы клеток или дцВКМ дважды промывали ФСБ и фиксировали смесью 5%-ного глутаральдегида и 4%-ного параформальдегида в соотношении 1:1 (оба Merck, Германия) на ФСБ в течение ночи. Образцы были обезвожены в возрастающих концентрациях этанола (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 100%) с последующей заменой этанола на ацетон (Химмед, Россия). Образцы высушивали в критической точке, после чего напыляли золотом-палладием и исследовали в сканирующем электронном микроскопе CamScanZ2 (Cambridge Instruments, Великобритания). Микроскопия была выполнена в общефакультетской лаборатории электронной микроскопии МГУ под руководством Г.Н. Давидовича.

Иммуноцитохимический анализ. Выявление основных белков ВКМ проводили на клеточных и децеллюляризованных препаратах с помощью непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания. Клетки промывали дважды ФСБ и фиксировали 4%-ным параформальдегидом с 0,2%-ным Triton X-100 при 37 °C 15 мин (препараты дцВКМ фиксировали без добавления Triton X-100). После отмывки от фиксатора в ФСБ неспецифическое связывание антител блокировали с помощью 1%-ного бычьего сывороточного альбумина (БСА; Sigma, США) 15 мин при комнатной температуре. Далее клетки или дцВКМ инкубировали с первичными кроличьими антителами к коллагену типа I (5 мкг/мл) и фибронектину (20 мкг/мл) человека (ИМТЕК, Россия). Для негативного контроля вместо первичных антител добавляли α-MEM с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой. Затем проводили инкубацию с козьими антителами против кроличьих иммуноглобулинов, меченными флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (10 мкг/мл) (ИМТЕК, Россия). Первую и вторую инкубации проводили в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере. Между окрашиваниями промывали в растворе ФСБ/БСА 3 раза по 5 мин. Препараты заключали в монтирующую среду Fluoroshield, содержащую ядерный краситель DAPI (Sigma-Aldrich, США). Образцы анализировали на флуоресцентном фазово-контрастном микроскопе Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония), оснащенный лампой Nikon Intensilight C-HGFI, и на конфокальном микроскопе LSM 780 (Zeiss, Германия) совместно с д.м.н. С.В. Буравковым (ФФМ МГУ). В качестве иллюстраций представлены репрезентативные данные одного из трех

независимых экспериментов.

Обработка изображений. Обработку изображений производили с помощью программ ImageJ и Zeiss LSM Image Browser. На изображениях настраивали яркость и контраст, производили наложение каналов флуоресценции.

Результаты и обсуждение

Иммуноцитохимическая характеристика белков ВКМ жтМСК. Для идентификации основных коллагеновых (коллаген I) и неколлагеновых (фибронектин) белков был использован метод непрямого иммуноцитохимического мечения. Большая часть позитивно-окрашенных структур при использовании антител к коллагену типа I была локализована внутриклеточно (рис. 1А, Б). Как известно, коллаген типа I экскретируется из клеток в виде молекул проколлагена, а окончательная сборка коллагеновых фибрилл происходит во внеклеточном пространстве [14, 15], поэтому мы вправе заключить, что обнаруженное нами внутриклеточное окрашивание соответствует молекулам проколлагена I. Флуоресцентная микроскопия показала, что фибронектин в значительном количестве присутствует во внеклеточном пространстве, формируя сеть из тонких пересекающихся волокон (рис. 1Г, Д).

С помощью СЭМ была исследована ультраструктура ВКМ культивируемых жтМСК (рис. 1В). ВКМ занимал пространство под клетками и между ними, а также выявлялись единичные волокна на клеточной поверхности (рис. 1Е). Молекулы ВКМ, как правило, образовывали плотную мембраноподобную структуру без четкого разделения на отдельные фибриллы, а также присутствовали области с пересекающейся сетью фибрилл ВКМ.

Получение препаратов дцВКМ жтМСК при использовании детергирующего агента Triton X-100. Для получения препаратов дцВКМ жтМСК использовали две модификации метода с использованием детергента Triton X-100 в сочетании с NH_4OH (гипотонический водный раствор и изотонический раствор в ФСБ).

Протокол с использованием гипотонического раствора (водный раствор 0,2%-ного Triton X-100 и 0,3%-ного NH_4OH) предполагал две стадии [11]. Сначала к монослою жтМСК добавляли водный раствор 0,2% Triton X-100 и микроскопически контролировали лизис клеточной мембраны. Ядра клеток при этом оставались видны. Последующая инкубация с NH_4OH приводила к удалению белковых и нуклеиновых компонентов (рис. 2А, Б). Однако иммуноцитохимическое (рис. 2В) и электронно-микроскопическое (рис. 2Г) исследование препаратов дцВКМ показало,

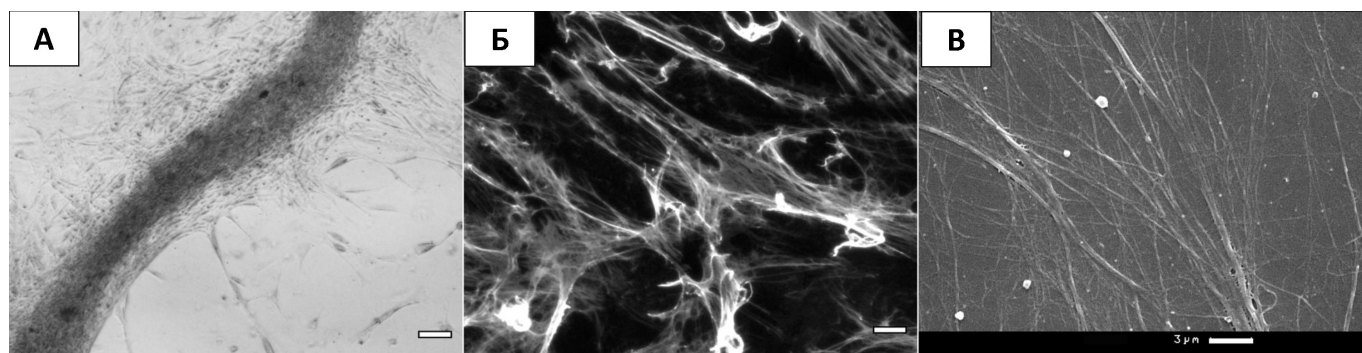


Рис. 3. Получение дцВКМ жтМСК с помощью RGD-пептида. А – формирование сфероидов, 96 ч инкубации с пептидом; Б – иммуноцитохимическое выявление фибронектина после удаления сфероидов (FITC); А, Б – Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония); В – визуализация дцВКМ с помощью сканирующей электронной микроскопии (CamScanZ2). Масштабный отрезок 40 мкм (А), 20 мкм (Б), 3 мкм (В).

что ВКМ не сохраняет своей структуры, остаются одиночные волокна и остатки клеточных мембран. Данные результаты повторились в трех независимых экспериментах, поэтому гипотонический протокол в дальнейшем не использовали.

С помощью изотонического раствора 0,5%-ного Triton X-100 в ФСБ с 20 мМ NH_4OH при 37 °С удалось получить однородные препараты дцВКМ. Слой ВКМ был хорошо виден даже при фазово-контрастной микроскопии (рис. 2Д). Иммуноцитохимический анализ выявил густую сеть фибронектина без ДНК-контаминаций, о чем свидетельствовало отсутствие окрашенного DAPI ядерного материала (рис. 2Е, Ж). Подобные результаты были получены в работе Харриса с коллегами на эмбриональных фибробластах мыши [16]. Молекулы коллагена в составе дцВКМ не выявлялись, что соотносится с данными, полученными на клеточных препаратах, когда иммуноцитохимически был обнаружен коллаген типа I, локализованный внутриклеточно в форме проколлагена. СЭМ-анализ подтвердил однородность слоя дцВКМ. Полученный после децеллюляризации ВКМ несколько отличался от того, что мы видели на нативных препаратах, но структурные особенности, описанные для интактного клеточного монослоя, были сохранены (рис. 23).

В классическом протоколе после использования лизирующих агентов препараты дцВКМ дополнительно обрабатываются ДНКазой I для удаления ДНК-контаминации. Однако существуют работы, в которых не использовали фермент и получали чистые препараты, пригодные для последующей рецеллюляризации [17–19], что делает этот этап факультативным.

Получение препаратов дцВКМ с использованием RGD-пептида. Помимо наиболее часто используемых протоколов децеллюляризации мы опробовали метод, применяемый для получения клеточных сфероидов. Для этого монослойные

жтМСК обрабатывали RGD-пептидом. Аминокислотная последовательность RGD (Arg-Gly-Asp) содержится в доменах белков ВКМ, таких как коллаген типа I и фибронектин, и является лигандом для связывания с интегринами при адгезии [20]. Пептиды, растворенные в среде, являются конкурентами за клеточные интегрины, что способствует откреплению клеток от подложки и образованию сфероидов из клеток [21, 22]. Мы предположили, что после удаления полученных сфероидов на подложке останется дцВКМ.

Нам не удалось получить полностью сформированные клеточные сфероиды, клетки откреплялись целым пластом (рис. 3А). По-видимому, это было связано с тем, что обычно сфероиды получают после достаточно коротких сроков культивирования из клеток, рассеянных изначально в высокой плотности, которые очень быстро (в течение нескольких дней) образуют монослой. Используемый нами протокол предполагал 14-суточное культивирование жтМСК с использованием аскорбата натрия для усиления продукции ВКМ, в результате чего клетки оказались «замурованными» в матрикс. Можно предположить, что крепкие связи жтМСК с матриксом препятствовали формированию сфероидов. С этим же, по-видимому, было связано и то, что после удаления клеток не оставалось чистого слоя дцВКМ (рис. 3Б). На изображении, полученном с помощью СЭМ, видны участки клеток, которые длинными отростками удерживаются на подложке. В пространствах, свободных от клеток, удалось выявить единичные тонкие нити матрикса и фрагменты сети фибронектина (рис. 3В).

Таким образом, иммуноцитохимически идентифицированы белки ВКМ жтМСК и выявлена ультраструктура ВКМ в пространстве между клетками в монослое. Наиболее эффективным для получения дцВКМ жтМСК является

использование изотонического раствора Triton X-100 в сочетании с NH_4OH , который позволяет получить однородный слой дцВКМ без контаминаций. Полученные данные перспективны с точки зрения последующего изучения влияния ВКМ на функциональную активность жтМСК и применения дцВКМ в качестве источника биосовместимых покрытий для получения скаффол-

дов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы Президиума РАН № 19.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parekkadan B., Milwid J.M. Mesenchymal stem cells as therapeutics // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2010. Vol. 12. P. 87–117.
2. Schraufstatter I.U., Discipio R.G., Khaldoyanidi S. Mesenchymal stem cells and their microenvironment // *Front. Biosci.* 2011. Vol. 16. P. 2271–2288.
3. Gattazzo F., Urciuolo A., Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. Vol. 1840. N 8. P. 2506–2519.
4. Lu H., Hoshiba T., Kawazoe N., Chen G. Autologous extracellular matrix scaffolds for tissue engineering // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32. N 10. P. 2489–2499.
5. Hynes R.O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils // *Science.* 2010. Vol. 326. N 5957. P. 1216–1219.
6. Joddar B., Hoshiba T., Chen G., Ito Y. Stem cell culture using cell-derived substrates // *Biomater. Sci.* 2014. Vol. 2. N 11. P. 1595–1603.
7. Hoshiba T., Lu H., Kawazoe N., Chen G. Decellularized matrices for tissue engineering // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2010. Vol. 10. N 12. P. 1717–1728.
8. Nöth U., Rackwitz L., Steinert A.F., Tuan R.S. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2010. Vol. 62. N 7–8. P. 765–783.
9. Bornstein P., Duksin D., Balian G., Davidson J.M., Crouch E. Organization of extracellular proteins on the connective tissue cell surface: relevance to cell-matrix interactions *in vitro* and *in vivo* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1978. Vol. 312. P. 93–105.
10. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32. N 12. P. 3233–3243.
11. Harvey A., Yen T., Aizman I., Tate C., Case C. Proteomic analysis of the extracellular matrix produced by mesenchymal stromal cells: implications for cell therapy mechanism // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. N 11: e79283.
12. Lin H., Yang G., Tan J., Tuan R.S. Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential // *Biomaterials.* 2012. Vol. 33. N 18. P. 4480–4489.
13. Akasov R., Gileva A., Zaytseva-Zotova D., Burov S., Chevalot I., Guedon E., Markvicheva, E. 3D *in vitro* co-culture models based on normal cells and tumor spheroids formed by cyclic RGD-peptide induced cell self-assembly // *Biotechnol. Lett.* 2016. Vol. 39. N 1. P. 45–53.
14. Myllyharju J., Kivirikko K.I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms // *Trends. Genet.* 2004. Vol. 20. N 1. P. 33–43.
15. Myllyharju J. Prolyl-4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis // *Matrix Biol.* 2003. Vol. 22. N 1. P. 15–24.
16. Harris G.M., Raitman I., Schwarzbauer J.E. Cell-derived decellularized extracellular matrices // *Methods Cell Biol.* 2018. Vol. 2. N 143. P. 97–114.
17. He F., Chen X., Pei M. Reconstruction of an *in vitro* tissue-specific microenvironment to rejuvenate synovium-derived stem cells for cartilage tissue engineering // *Tissue Eng. Part A.* 2009. Vol. 15. N 12. P. 3809–3821.
18. Sun Y., Li W., Lu Z., Chen R., Ling J., Ran Q., Jilka R.L., Chen X.D. Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix // *FASEB J.* 2011. Vol. 25. N 5. P. 1474–1485.
19. Prewitz M.C., Seib F.P., von Bonin M., Friedrichs J., Stißel A., Niehage C., Werner C. Tightly anchored tissue-mimetic matrices as instructive stem cell microenvironments // *Nat. Methods.* 2013. Vol. 10. N 8. P. 788–794.
20. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996. Vol. 12. P. 697–715.
21. Zhang L., Hum M., Wang M., Li Y., Chen H., Chu C., Jiang H. Evaluation of modifying collagen matrix with RGD peptide through periodate oxidation // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2005. Vol. 73. N 4. P. 468–475.
22. Lam J., Segura T. The modulation of MSC integrin expression by RGD presentation // *Biomaterials.* 2013. Vol. 34. N 16. P. 3938–3947.

Поступила в редакцию 20.06.2019 г.
После доработки 16.09.2019 г.
Принята в печать 23.09.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

SELECTION OF THE OPTIMAL PROTOCOL FOR PREPARATION OF DECELLULARIZED EXTRACELLULAR MATRIX OF HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS

D.K. Matveeva^{1, 2}, E.R. Andreeva^{1, *}, L.B. Buravkova^{1, 2}

¹*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Horoshevskoe sh. 76A Moscow, 123007, Russia;*

²*Department of Ecological and Extreme Medicine, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia*

**e-mail: andreeva1564@gmail.com*

Currently, biological scaffolds composed of extracellular matrix (ECM) are being examined actively for the needs of regenerative medicine. ECM substrates are prepared by decellularization and used to deliver cells to damaged tissue. Native scaffold of ECM have an advantage over bioengineered ones because ECM retains natural biologic cues that provide efficient reparative cell functions. Mesenchymal stromal cells (MSCs) have multipotent potential of differentiation and secrete a wide range of bioactive molecules. In this regard, MSCs are important intermediaries for tissue repair. The ECM as a critical component of the MSC niche modulating their functional activity, including migration, proliferation and differentiation, as well as supports their potential for self-renewal. *In vitro* investigations would be useful in elucidation of how biological scaffolds can affect the reparative functions of MSCs. There are several different protocols for decellularization. Since ECM of various cell types differs qualitatively and quantitatively, these protocols should be optimized for each specific case. In the present study we compared the effectiveness of approach to prepare decellularized ECM (dcECM) of adipose-derived MSC (adMSC): Triton X-100/NH₄OH solution in phosphate buffered solution or H₂O, and the possibility of using dcECM after spheroids were formed. ECM-derived substrates were analyzed with immunocytochemistry and scanning electron microscopy. During long-term cultivation MSCs produced a well-developed ECM, which after treatment with phosphate buffered solution of Triton X-100/NH₄OH maintaining the structure close to native one. It was impossible to receive a uniform dcECM layer, when water solution of Triton X-100/NH₄OH was used. On the scanning electron microscopy images single fiber of ECM were revealed in this case. We detected fragments of ECM and cells after spheroids formation upon of RGD peptides treatment. Therefore, this method was not effective for obtaining dcECM of adMSCs.

Keywords: *human mesenchymal stromal cells, extracellular matrix, decellularization, regenerative medicine, immunocytochemistry, scanning electron microscopy*

Сведения об авторах

Матвеева Диана Константиновна — аспирант лаборатории клеточной физиологии ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-65-44; e-mail: *matveeva.dajana@yandex.ru*

Андреева Елена Ромуальдовна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории клеточной физиологии ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-63-01; e-mail: *andreeva1564@gmail.com*

Буравкова Людмила Борисовна — чл.-корр. РАН, докт. мед. наук, зав. лабораторией клеточной физиологии ИМБП РАН; проф. кафедры экологической и экстремальной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ. Тел.: 8-499-195-68-76; e-mail: *buravkova@imbp.ru*

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.113.7

АНАЛИЗ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ДНК-БЕЛКОВЫХ КРИСТАЛЛОВ
*IN VITRO*А.В. Моисеенко¹, Н.Г. Лойко^{2, 3}, О.В. Чертков¹, А.В. Феофанов^{1, 4}, Ю.Ф. Крупянский³,
О.С. Соколова^{1, *}¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²ФИЦ «Биотехнологии РАН», Российская академия наук, Россия, г. Москва, 119071, Ленинский просп. д. 33, стр. 2;³ФИЦ «Химической физики им. Н.Н. Семенова РАН», Российская академия наук, Россия, г. Москва, 119991, Москва, ул. Косыгина д. 4;⁴Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Универсальным ответом бактерий *Escherichia coli* на стресс является усиление синтеза специфических гистоноподобных белков Dps, которые связывают и защищают бактериальную ДНК. В результате в цитоплазме голодающих бактерий могут наблюдаться трехмерные кристаллоподобные массивы. Мы подобрали условия для получения ко-кристаллов ДНК-Dps *in vitro* и изучили их элементный состав с использованием аналитической электронной микроскопии. Было обнаружено, что Dps в составе ко-кристалла сохраняет свою ферритин-подобную активность, то есть может стимулировать окисление ионов Fe^{2+} до Fe^{3+} и способствовать накоплению железа в форме Fe_2O_3 .

Ключевые слова: *E. coli*, нуклеоид, Dps, электронная аналитическая микроскопия, биокристаллизация, флуоресцентная микроскопия

Белок Dps продуцируется в клетках *Escherichia coli*, относится к классу оксидоредуктаз, окисляющих ионы металлов [1]. Недавний скрининг выявил в бактериальной ДНК области генома, преимущественно ответственные за связывание с Dps [2]. Сайты, имеющие сродство к Dps, перекрываются с сайтами, ответственными за взаимодействие с другими ДНК-связывающими белками, в том числе РНК-полимеразами. Таким образом, предполагается, что Dps может модулировать транскрипцию бактериальной хромосомы [3], препятствуя синтезу РНК с некоторых участков посредством конкуренции с РНК-полимеразой или, наоборот, конкурируя с ингибиторами, активировать транскрипцию. Dps взаимодействует с ДНК, не ингибируя транскрипцию, но ограничивая доступ к ДНК других белков, таких как эндонуклеазы рестрикции.

Синтез белка Dps усиливается при переходе *E. coli* в стационарную фазу роста [1]. При этом образуются высоко упорядоченные и стабильные ко-кристаллы с ДНК. Внутри кристаллов бактериальная ДНК конденсирована и

защищена от различных повреждений. Кроме этого, Dps защищает генетический аппарат бактериальной клетки от ультрафиолетового и гамма-излучения, температурного стресса и кислотно-основного воздействия [4].

Этот механизм, видимо, обеспечивает возобновление роста бактериальных клеток при улучшении внешних условий [5]. Плотные упакованные конденсированную ДНК с Dps различной морфологии находили при исследовании ультратонких срезов покоящихся клеток *E. coli*, архей, эндоспор *B. thuringiensis* и *Br. laterosporus*, экзоспор стрептомицетов, клеток артробактера и псевдомонад [6]. Клетки-персисторы, содержащиеся в популяциях патогенных бактерий и обладающие полирезистентностью к лекарственным препаратам, также вероятно обладают кристаллическим нуклеоидом, что, возможно, и обеспечивает их устойчивость к антибиотикам.

Предполагают, что эффективное образование ко-кристаллов ДНК-Dps вызвано различным содержанием двухвалентных катионов в последовательных фазах жизнедеятельности

бактериальной клетки. В частности, в лог-фазе взаимодействие ДНК-Dps может ингибироваться пониженным содержанием ионов Mg^{2+} , а в стационарной фазе — наоборот, активироваться повышенным содержанием этих ионов [7]. Ранее было также показано, что добавление ионов железа Fe^{2+} стабилизирует основную функциональную олигомерную форму белка Dps [8]. Однако влияние двухвалентных катионов на структуру ко-кристаллов ДНК-Dps *in vitro* до сих пор не было изучено. Также неизвестна истинная конформация ДНК в нанокристаллических комплексах ДНК-Dps. Мы использовали флуоресцентно-меченый фрагмент ДНК для его визуализации в составе ко-кристалла, что позволило подобрать условия для получения тонких ко-кристаллов ДНК-Dps *in vitro* [9]. В данной работе мы изучили элементный состав ко-кристаллов ДНК-Dps, полученных в присутствии ионов железа и цинка, с использованием аналитической электронной микроскопии.

Материалы и методы

Сборка меченой ДНК-матрицы. Флуоресцентно-меченую ДНК-матрицу длиной 165 п.н., содержащую последовательность s603, получали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), как описано ранее [9]. Очистку ДНК осуществляли с помощью набора для очистки ПЦР-продуктов (Sigma), следуя инструкциям производителя. Концентрацию ДНК определяли по оптической плотности при длине волны 260 нм. Концентрация составила 0,25 мкг/мкл. В результате была получена меченая ДНК, имеющая следующую последовательность:

AGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCG
CGCTCCCGCCTTCCGTGTGTTGTCGTCTCT
CGGGCGTCTAAGTACGCTTAGCGCACGGTA
GAGCGCAATCCAAGGCTAACCACCGTGCAT
CGATGTTGAAAGAGGCCCTCCGTCCTTATTA
CTTCAAGTCCCTGGGGT

Экспрессию и очистку белка Dps проводили по протоколу, описанному ранее [8]. Для этого штамм *E. coli* BL21-Gold трансформировали плазмидой pET-DPS. Культуральную среду LB (Lysogeny broth; с добавлением 150 мг/л ампициллина и 10 мМ лактозы) инокулировали единичной колонией бактерий и инкубировали 16–18 ч в шейкере-инкубаторе при 37 °С. Клетки осаждали центрифугированием (5000 g, 15 мин), ресуспендировали в 0,1 М Трис-НСl буфере (pH 7,5) и разрушали ультразвуковым дезинтегратором. Лизат центрифугировали при 13000g 10 мин. Супернатант очищали с помощью ионообменной хроматографии на смоле ДЕАЕ-Сефадекс-A25. Дальнейшую очистку проводили с

помощью гель-фильтрации на Сефадексе-G200 и высаливания белка с последующим диализом против буфера, содержащего 0,2М NaCl, 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5).

Получение ко-кристаллов ДНК-Dps *in vitro*.

Ко-кристаллы получали путем смешивания очищенного белка Dps (3,4 мг/мл) с линейным флуоресцентно-меченым фрагментом ДНК (0,25 нг/мкл). Для флуоресцентных исследований 3 мкл раствора Dps добавляли к 3 мкл ДНК в силиконовой лунке с последующим добавлением 3 мкл водного раствора ЭДТА (0,14 мМ) и 1 мкл водного раствора (10 мМ) одной из солей: $FeCl_3$, $K_4[Fe(CN)_6]$ либо $ZnSO_4$. Соотношение Dps/ДНК составило 14:1.

Для исследований с помощью ПЭМ (просвечивающей электронной микроскопии), ко-кристаллы формировали непосредственно на сетке для электронной микроскопии. Для этого каплю (1,5 мкл) очищенного Dps добавляли к капле (1,5 мкл) ДНК, нанесенной на покрытую углеродом медную сетку (SPI, США). Далее для образования кристаллов к смеси добавляли 1,5 мкл ЭДТА (0,14 мМ). Для изучения влияния на кристаллы катионов железа и цинка к смеси добавляли 0,5 мкл 10 мМ одного из растворов: $FeCl_3$, $K_4[Fe(CN)_6]$ или $ZnSO_4$.

Конфокальная микроскопия. Оценку эффективности взаимодействия Dps с ДНК производили флуоресцентным методом в лунках камеры, прикрепленной к покровному стеклу. Изображения получали с помощью инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM710-Confocor3 (Zeiss, Германия) с использованием водоиммерсионного объектива C-Apochromat 40x/1,20. Флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 514,5 нм и детектировали в диапазоне 524–639 нм. Латеральное и аксиальное разрешение составляли соответственно 0,2 и 0,6 мкм.

Электронная микроскопия. ПЭМ-исследования были выполнены на просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100 (JEOL, Япония) с катодом из гексаборита лантана (LaB_6) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Объективная апертура — 40 мкм. Изображения были получены на детекторе Gatan Ultrascan 1000FTXP с размером матрицы 2K×2K при реальном увеличении 48200× (для образцов с $FeCl_3$ и $K_4[Fe(CN)_6]$) и 6425× (для образцов с $ZnSO_4$).

Спектроскопия характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ). Для получения спектров использовался спектрометр Gatan GIF Quantum ER (Gatan, США). Входная апертура спектрометра — 5 мм. Ожидаемое спектральное разрешение, измеренное по полуширине пика

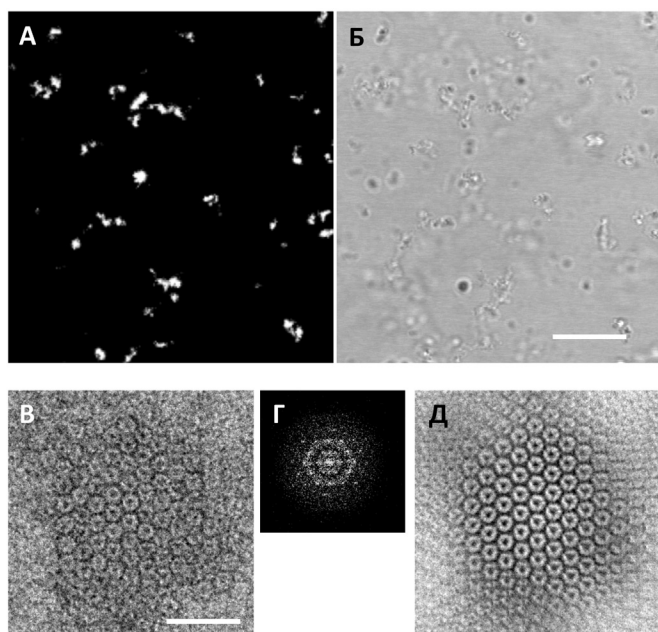


Рис. 1. Получение ко-кристаллов ДНК-Dps в присутствии ЭДТА и FeCl_3 . (А) Ко-кристаллы ДНК-Dps, наблюдаемые в конфокальный микроскоп, флуоресцентное изображение; (Б) изображение той же области в проходящем свете; масштабный отрезок — 50 мкм. (В) Ко-кристалл ДНК-Dps в ПЭМ с окраской уранилацетатом; масштабный отрезок — 50 нм. (Г) Преобразование Фурье от выбранного участка; (Д) фильтрованное проекционное изображение ко-кристалла ДНК-Dps.

нулевых потерь, не хуже, чем 1,2 эВ.

Спектрометр использовался в дифракционно-связанном режиме: проекционная система микроскопа в режиме энергетически фильтрованной просвечивающей электронной микроскопии (ЭФПЭМ), угол сбора сигнала ограничен объективной апертурой до 10 мрад. Участок на образце для набора спектров ограничивался с помощью селективной дифракционной апертуры (SAD), либо с помощью входной апертуры спектрометра в случае малых увеличений.

Для детектирования железа выбран пик Fe L_{2,3} на смещении 708 эВ, для детектирования цинка — пик Zn L_{2,3} на смещении 1020 эВ. У L_{2,3}-пигов переходных металлов в спектрах СХПЭЭ хорошее соотношение сигнал-шум, что позволяет обнаруживать даже небольшие концентрации атомов этих элементов. Однако малое сечение рассеяния по L_{2,3}-пикам и их характерная структура («white lines») затрудняют точное вычисление сечений рассеяния и, как следствие, количественный анализ содержания выбранных элементов [10].

Для получения спектров в области L_{2,3}-пика железа использовались следующие параметры: увеличение микроскопа 48200×, дисперсия 0,05 эВ/канал при 2048 каналах, диапазон спектра

698–800 эВ, время экспозиции одного спектра 30 с, суммирование по 10 спектрам.

Для набора спектров в области L_{2,3}-пика цинка использовалось увеличение 6425×, дисперсия 0,25 эВ/канал при 2048 каналах, диапазон спектра 870–1382 эВ, время экспозиции 5 с, суммирование по 10 спектрам, объективная апертура 60 мкм, ограничивающая угол сбора сигнала до не менее, чем 20 мрад.

На каждом из образцов был произведен предварительный локальный контроль толщины образца методом ЭФПЭМ-изображений для оценки необходимости введения поправок на многократное рассеяние. Толщина всех образцов находится в пределах 0,2 длин свободного пробега электрона для данного ускоряющего напряжения. Поэтому поправки на многократное рассеяние не применяли.

Во всех приведенных спектрах СХПЭЭ удалена фоновая составляющая. Фоновую составляющую экстраполировали с помощью степенной функции с входным окном 698–705 эВ для спектров железа и 870–1000 эВ для спектров цинка. Обработка спектров была произведена в программном пакете «Digital Micrograph» (Gatan, США).

Результаты и обсуждение

Процесс биокристаллизации нуклеоида при голодании прокариотических клеток к настоящему времени частично изучен методом криоэлектронной микроскопии [11] и рентгеноструктурного анализа [12]. Однако до сих пор существуют разногласия по поводу истинной конформации ДНК нанокристаллических комплексов ДНК-Dps в клетках. Данный вопрос является важным, поскольку имеет отношение к проблеме организации генетического материала, которая влияет на трансляцию и экспрессию генов и, ввиду этого, критически важна для функционирования организмов.

Использование флуоресцентно-меченого фрагмента ДНК позволило нам непосредственно в растворе наблюдать ко-кристаллы ДНК-Dps (рис. 1). Так как на формирование ко-кристаллов влияет концентрация двухвалентных катионов [7], мы добавляли к смеси хелатирующий агент ЭДТА в концентрации 0,14 мМ и сразу же (не более, чем через 2–5 мин) наблюдали образование небольших флуоресцентных образований (таблица). Добавление двухвалентных катионов Zn^{2+} в форме ZnCl_2 или Fe^{2+} в форме $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ приводило к некоторому увеличению линейных размеров флуоресцентных образований, а при использовании трехвалентного Fe^{3+} в форме FeCl_3 размеры образований оказа-

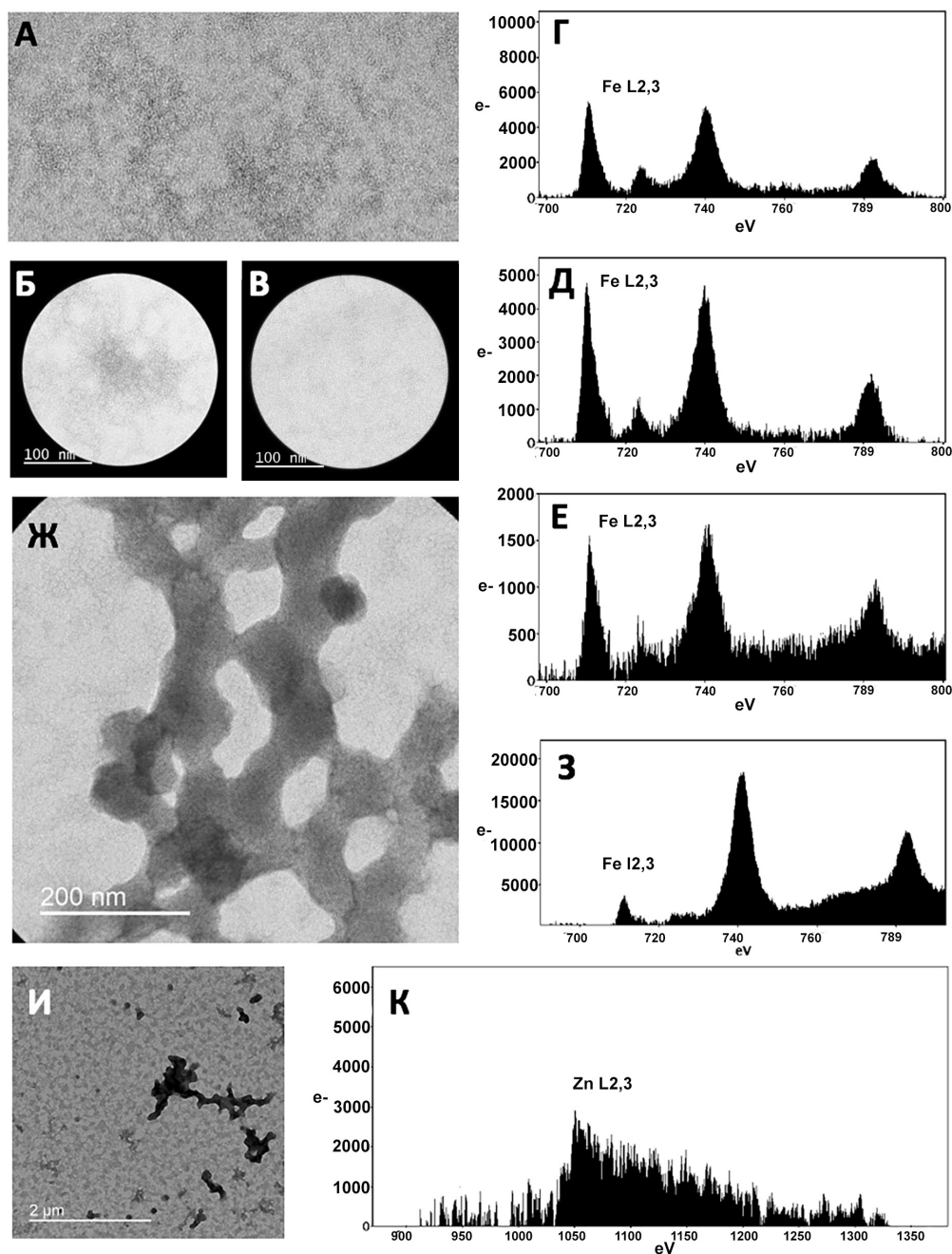


Рис. 2. Элементный анализ ко-кристаллов ДНК-Dps. (А) ПЭМ-изображение участка образца с FeCl_3 , содержащего ко-кристаллы ДНК-Dps; масштабный отрезок — 100 нм. (Б) Участок, ограниченный селективной апертурой, содержащий ко-кристаллы ДНК-Dps. (В) Участок, ограниченный селективной апертурой, не содержащий ко-кристаллов. (Г, Д, Е) спектры СХПЭЭ в области L2,3-пика железа, соответствующие участкам А, Б, В. (Ж) ПЭМ-изображение участка образца с $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, содержащего ко-кристаллы ДНК-Dps, ограниченного селективной апертурой 100 мкм. (З) Спектр СХПЭЭ в области L2,3-пика железа с участка Ж. (И) участок образца с ZnSO_4 , содержащий ко-кристаллы ДНК-Dps. (К) Соответствующий спектр СХПЭЭ, содержащий L-2,3 пик цинка.

лись в 2 раза больше, чем в контроле без ионов (с EDTA).

Использование ПЭМ с негативным окрашиванием образцов подтвердило, что флуоресцентные образования, наблюдаемые в растворе, имеют кристаллическую структуру (рис. 1, В–Д) с четкими очертаниями частиц с размерами,

нии атомов железа и цинка использовался метод ПЭМ-СХПЭЭ с ограничением области набора данных с помощью селективной апертуры.

На рис. 2, Г–Е представлены СХПЭЭ-спектры образца с FeCl_3 , полученные как с участков, содержащих ко-кристаллы белок-ДНК, так и с тех, что их не содержали (рис. 2, А–В). На

соответствующими размерам додекамера Dps [1]. Это свидетельствует о том, что ко-кристаллы содержат ДНК и Dps.

Обзорные спектры СХПЭЭ с образцов с FeCl_3 и $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ показали, что максимумы в области L2,3-пика железа наблюдаются на 710 эВ и 723 эВ, однако интенсивность этих максимумов оказалась крайне мала. Еще меньшая интенсивность наблюдалась на образцах с ZnSO_4 у L2,3-пика цинка. Это свидетельствует о том, что железо и цинк в ко-кристаллах находятся в количествах, недостаточных для построения карт распределения атомов этих элементов методом энергетически-фильтрованных изображений. Построение карт методом СПЭМ-СХПЭЭ (СПЭМ — сканирующая просвечивающая электронная микроскопия) также оказалось невозможным по причине сильного дрейфа и повреждения образцов электронным лучом высокой интенсивности в СПЭМ во время набора данных. Поэтому для получения информации о пространственном распределе-

Таблица

Линейные размеры кристаллов, наблюдаемых в конфокальный микроскоп, зависят от ионного состава раствора

Условия образования ко-кристаллов	Контроль (EDTA)	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Zn ²⁺
Размер*, мкм	1,8±1,0	2,8±1,4	3,6±2,7	2,62±1,9
Доверительный интервал	0,25	0,35	0,3	0,8

*Среднее ± стандартное отклонение

спектрах присутствуют пики на 709 эВ и 722 эВ, соответствующие L3- и L2-пикам железа. Данные спектры получены в одинаковых условиях. Видно, что сигнал по L2,3-линии железа в областях образца, не содержащих белок-ДНК, присутствует, но имеет существенно меньшую интенсивность, чем в областях с ко-кристаллами. В соответствии с данными о структуре L3-пика железа [13] можно сделать вывод, что атомы железа находятся в степени окисления 3+. Пик на 707 эВ, соответствующий железу в степени окисления 2+ в полученных спектрах отсутствует. Следует также иметь в виду, что в спектрах, полученных со всех рассмотренных образцов, присутствуют интенсивные максимумы на 740 эВ и на 782 эВ. Эти максимумы наблюдаются на различных участках всех изученных образцов, они, вероятно, соответствуют M4-линии Cs и M5-линии Ba. Эти элементы могут входить в качестве примесей в уранилацетат, используемый для негативного контрастирования.

На рис. 2, Ж–З представлены СХПЭЭ-спектры образца с K₄[Fe(CN)₆]. Для улучшения соотношения сигнал-шум была выбрана селективная апертура большего диаметра – 100 мкм. На этом образце интенсивность L2,3-пика железа относительно интенсивности M4-пика цезия(Cs) существенно более низкая, чем на образце с FeCl₃. Видно, что положение L3-пика также соответствует железу в степени окисления 3+. Сигнал от железа 2+ в спектре отсутствует.

Известно, что в свободном состоянии каталитические центры Dps окисляют ионы железа. Окисленное железо проникает во внутреннюю полость белка Dps, образуя неорганическое ядро [2]. Мы полагаем, что нечто подобное может происходить с Dps, находящимся в составе ко-кристалла с ДНК. В кристаллическом состоянии Dps, по-видимому, также может стимулировать накопление железа в форме Fe₂O₃ (или Fe₃O₄) во внутренней полости олигомера. Таким образом, полученные нами данные расширяют представление о роли Dps в клетке.

Спектры с образцов с ZnSO₄ представлены на рис. 2, И–К. Наблюдается пик на 1043 эВ, что соответствует положению L2,3-пика цинка. Однако интенсивность этого пика оказалась мала. Это подтверждает данные о том, что Dps не связывает на постоянной основе двухвалентные катионы (кроме железа, которое он окисляет) и что этот процесс имеет динамический характер [7].

Таким образом, в данной работе при использовании флуоресцентно-меченого фрагмента ДНК методом конфокальной лазерной микроскопии показано образование в растворе, содержащем ионы железа, ко-кристаллов ДНК с белком Dps. При сравнении наших экспериментальных данных с данными для очищенного белка Dps [2], сделано предположение, что Dps в составе ко-кристалла сохраняет свою ферритин-подобную активность, то есть может стимулировать окисление ионов Fe²⁺ до Fe³⁺ и способствовать накоплению железа в форме Fe₂O₃ (или Fe₃O₄) во внутренней полости олигомера, как показано ранее. Эти данные можно в дальнейшем использовать при изучении трехмерной организации генетического материала в бактериальных клетках.

Аналитическая электронная и флуоресцентная микроскопии выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-30003). Экспрессия и очистка белка Dps проводились в рамках государственного задания Минобрнауки России (тема 0082-2014-0001, №АААА-А17-117040610310-6 и тема 0104-2019-0005). Электронная микроскопия проводилась с использованием аналитического электронного микроскопа JEOL2100 (JEOL, Япония) в составе уникальной научной установки «Трёхмерная электронная микроскопия и спектроскопия» биологического факультета МГУ.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Almiron M., Link A.J., Furlong D., Kolter R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli* // *Genes Dev.* 1992. Vol. 6. P. 2646–2654.
2. Antipov S.S., Tutukina M.N., Preobrazhenskaya E.V., Kondrashov F.A., Patrushev M.V., Toschakov S.V., Dominova I., Shvyreva U.S., Vrublevskaya V.V., Morenkov O.S., Sukharicheva N.A., Panyukov V.V., Ozoline O.N. The nucleoid protein Dps binds genomic DNA of *Escherichia coli* in a nonrandom manner // *Plos One*. 2017. Vol. 12. N 8: e0182800.
3. Shen B.A., Landick R. Transcription of bacterial chromatin // *J. Mol. Biol.* 2019. N S0022-2836(19).30325-0.
4. Martinez A., Kolter R. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps // *J. Bacteriol.* 1997. Vol. 179. N 16. P. 5188–5194.
5. Minsky A., Shimoni E., Frenkiel-Krispin D. Stress, order and survival // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. Vol. 3. P. 50–60.
6. Loiko N.G., Suzina N.E., Soina V.S., Smirnova T.A., Zubasheva M.V., Azizbekyan R.R., Sinitsyn D.O., Tereshkina K.B., Nikolaev Y.A., Krupyanskiy Y.F., El'-Registan G.I. Biocrystalline structures in nucleoids of stationary and dormant cells of procarior // *Microbiology*. 2017. Vol. 86. N 6. P. 714–727.
7. Frenkiel-Krispin D., Levin-Zaidman S., Shimoni E., Wolf S.G., Wachtel E.J., Arad T., Finkel S.E., Kolter R., Minsky A. Regulated phase transitions of bacterial chromatin: A non-enzymatic pathway for generic DNA protection // *EMBO J.* 2001. Vol. 20. N 5. P. 1184–1191.
8. Antipov S., Turishchev S., Purtov Y., Shvyreva U., Sinelnikov A., Semov Y., Preobrazhenskaya E., Berezhnoy A., Shusharina N., Novolokina N., Vakhtel V., Artyukhov V., Ozoline O. The oligomeric form of the *Escherichia coli* Dps protein depends on the availability of iron ions // *Molecules*. 2017. Vol. 22. N 11: 1904.
9. Moiseenko A., Loiko N., Tereshkina K., Danilova Y., Kovalenko V., Chertkov O., Feofanov A.V., Krupyanskii Y.F., Sokolova O.S. Projection structures reveal the position of the DNA within DNA-Dps co-crystals // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. Vol. 517. N 3. P. 463–469.
10. Egerton R.F. Electron energy-loss spectroscopy in the electron microscope, third edition. N.Y.: Springer, 2011. 491 pp.
11. Dadinova L.A., Chesnokov Y.M., Kamyshevsky R.A., Orlov I.A., Petoukhov M.V., Mozhaev A.A., Soshinskaya E.Y., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Orekhov A.S., Vasiliev A.L., Shtykova E.V. Protective Dps-DNA co-crystallization in stressed cells: an in vitro structural study by small-angle X-ray scattering and cryo-electron tomography // *FEBS Lett.* 2019. Vol. 593. N 12. P. 1360–1371.
12. Loiko N.G., Danilova Ya.A., Moiseenko A.V., Demkina E.V., Kovalenko V.V., Tereshkina K.B., El'-Registan G.I., Sokolova O.S., Krupyanskii Yu.F. Condensation of nucleoid in *Escherichia coli* cell as a result of prolonged starvation // *ArXiv Quantitative Biol.* 2019. Vol. 1901: 11322.
13. Garvie L.A.J., Craven A.J., Brydson R. Use of electron-energy loss near-edge fine structure in the study of minerals // *Am. Mineral.* 1994. Vol. 79. N 5–6. P. 411–425.

Поступила в редакцию 07.07.2019 г.
После доработки 11.08.2019 г.
Принята в печать 17.09.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

ANALYSIS OF ELEMENT COMPOSITION OF DNA-PROTEIN CRYSTALS
IN VITRO

A.V. Moiseenko¹, N.G. Loiko^{2, 3}, O.V. Chertkov¹, A.V. Feofanov^{1, 4}, Yu.F. Krupyanskii³,
O.S. Sokolova^{1, *}

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

²Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 33–2, Moscow, 119071, Russia;

³N.N. Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygina st., 4, Moscow, 117977, Russia;

⁴Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklouho-Maclay st. 16/10 Moscow, 117997, Russia

*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

The universal response of *Escherichia coli* to stress is the enhancement of the synthesis of specific histone-like Dps proteins that bind bacterial DNA. As a result, two-dimensional and three-dimensional crystalline arrays can be observed in the cytoplasm of starving bacteria. We selected the conditions for obtaining *in vitro* co-crystals of DNA-Dps and studied their elemental composition using analytical electron microscopy. We found that Dps in the co-crystal retains its ferritin-like activity, that is, it can stimulate the oxidation of Fe^{2+} ions to Fe^{3+} and facilitate the accumulation of iron in the form of Fe_2O_3 in the inner cavity of the oligomer.

Keywords: *E. coli*, nucleoid, Dps, electronic analytical microscopy, biocrystallization, fluorescence microscopy

Сведения об авторах

Моисеев Андрей Владимирович — вед. инженер лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: postmoiseenko@gmail.com

Чертков Олег Валериевич — канд. биол. наук, вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: ochertkov@mail.ru

Лойко Наталия Геннадиевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории выживаемости микроорганизмов ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. Тел.: 8-499-135-21-39; e-mail: loikonat@mail.ru

Крупянский Юрий Федорович — докт. физ.-мат. наук, гл. науч. сотр., рук. отдела строения вещества ФИЦ «Химической физики им. Н.Н. Семенова РАН». Тел.: 8-495-939-73-00; e-mail: yufk@chph.ras.ru

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Соколова Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.21

ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНА H4 НА ДИСТАНЦИОННЫЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ХРОМАТИНЕЕ.В. Низовцева¹, Н.С. Герасимова², В.М. Студитский^{1, 2, *}¹*Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA;*²*Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu*

Дистанционные взаимодействия ДНК играют важную роль в регуляции генов эукариот. Структура хроматина участвует в этом процессе, но влияние модификаций гистонов детально не изучено. В настоящей работе исследована роль ацетилирования гистона H4 по остатку лизина в положении 16 (H4K16-Ац) в энхансер-промоторном взаимодействии (ЭПВ). Данная модификация ассоциирована с эухроматином и участвует в декомпактизации хроматиновой фибриллы. Нами показано, что влияние H4K16-Ац на ЭПВ *in vitro* зависит от степени упаковки ДНК. Так, при неполном насыщении ДНК октамерами гистонов транскрипция ингибируется в присутствии этой модификации, а в случае, если нуклеосомы занимают все доступные положения на ДНК, ЭПВ несколько стимулируется.

Ключевые слова: хроматин, транскрипция, регуляция, энхансеры, гистоны, модификации, ацетилирование

Транскрипция большинства генов эукариот регулируется с помощью энхансеров — последовательностей ДНК, связывающих транскрипционные факторы и активирующих транскрипцию на различно удалённых промоторах [1, 2]. Для того чтобы активироваться, гены должны быть локализованы внутри участка так называемого «открытого» хроматина, или эухроматина [3] — ДНК-гистонового комплекса, характеризующегося менее компактной структурой и определенными гистоновыми модификациями (например, H4K16-Ац и H3K27-Ац) [4]. Также известно, что подавляющее большинство энхансеров активируют свои целевые промоторы *in cis*, при этом разделяющий их участок ДНК образует петлю [4]. Эти и другие работы [2, 5] свидетельствуют о важной роли структуры хроматина в поддержании взаимодействия между энхансером и промотором. Кроме того, было показано, что компактизация ДНК при формировании хроматина, а следовательно, и уменьшение среднего расстояния между энхансером и промотором, не является единственной причиной, по которой хроматин стимулирует взаимодействия между участками генома [6].

Чтобы понять, как именно отдельные компоненты хроматина влияют на его пластичность и динамику, а также на возможность поддерживать эффективное энхансер-промоторное взаимодействие (ЭПВ), нами была разработана система транскрипции *in vitro*, позволяющая количественно оценить скорость ЭПВ. Была получена матрица, содержащая промотор и удаленный от него энхансер. Продолжительный участок ДНК между ними включал 13 расположенных друг за другом синтетических последовательностей «601», имеющих высокое сродство к гистонам и обеспечивающих сборку точно расположенных на ДНК нуклеосом и спонтанное образование хроматиновой фибриллы [7, 8]. Используя эту экспериментальную систему, мы продемонстрировали важную роль концевых участков («хвостов») сердцевинных гистонов, а также свободных участков ДНК [9] в поддержании эффективного ЭПВ [10].

В настоящей работе было определено действие ковалентной модификации одного из гистонов — H4K16-Ац — на ЭПВ в хроматине. Ранее было показано, что данная модификация ассоциирована с эухроматином [11] и влияет на

его структуру путем декомпактизации хроматиновой фибриллы [12].

Материалы и методы

Белки. Все белки транскрипционного комплекса были очищены, как описано ранее [13].

Сборка хроматиновых матриц. Октамеры гистонов без модификаций и с ацетилизацией гистона H4 по лизину в 16-м положении были получены методом, использованным ранее [14], хроматин с удаленными концевыми доменами гистонов – в результате трипсинолиза очищенного хроматина, выделенного из эритроцитов кур [15].

Сборка нуклеосом на линейизованной плазмиде pYP05 была проведена при различных соотношениях октамеров гистонов и матрицы (0,9:1; 1:1) с использованием градиентного диализа против буферного раствора, содержащего NaCl в концентрации от 2 М до 10 мМ [16].

Проверка качества сборки хроматиновых матриц. Проверка ожидаемого позиционирования нуклеосом на используемых матрицах была проведена с использованием метода анализа чувствительности к ферментативному расщеплению. Собранный хроматин был проинкубирован с рестрикционными эндонуклеазами *AluI* и *ScaI* (New England Biolabs, США). ДНК была очищена и использована как матрица для полимеразной цепной реакции с одним радиоактивно меченым праймером (метод удлинения праймера) с использованием ДНК-полимеразы Taq (New England Biolabs, США). Праймер отжигался непосредственно перед промотором [7].

Транскрипция. Условия для транскрипции *in vitro* были оптимизированы для максимального использования хроматиновой матрицы. Транскрипция была проведена, как описано ранее [13]. Во всех экспериментах использовалась одинаковая концентрация матрицы.

На матрице был собран закрытый инициаторный комплекс (ИКз). Один раунд транскрипции был проведен в реакционной смеси объемом 50 мкл в трис-ацетатном буфере (50 мМ, pH 8,0), содержащем 100 мМ ацетат калия, 8 мМ ацетат магния, 27 мМ ацетат аммония, 0,7% ПЭГ-8000 и 0,2 мМ дитиотреитол при концентрации ДНК или хроматина 1 нМ, а также 10 нМ РНК-полимеразы, 300 нМ сигма-фактора 54 и белковых факторов регуляции азотного обмена NtrC и NtrB в концентрациях 120 и 400 нМ соответственно. Сначала все компоненты были смешаны вместе в транскрипционном буфере (общий объем 40 мкл), инкубировались 15 мин при 37 °C для формирования закрытого комплекса. Далее 5 мкл 40 мМ АТФ, разведенного в транскрипци-

онном буфере, было добавлено к реакционной смеси до конечной концентрации 4 мМ. Реакция проводилась в течение 2 мин при 37 °C для формирования открытого инициаторного комплекса (ИКо). Затем смесь из четырех рибонуклеотидтрифосфатов (4 мМ каждого) в транскрипционном буфере с 2,5 мкКи [α - 32 P]-ГТФ (3000 Ки/мМ) и 2 мг/мл гепарина была добавлена к реакции для инициации элонгации и ограничения циклов транскрипции до одного раунда. Реакция проводилась при 37 °C в течение 15 мин и была остановлена смесью фенол:хлороформ (1:1). Радиоактивно меченая РНК была очищена и проанализирована в денатурирующем полиакриламидном геле. Гель был высушен, перенесен на радиочувствительный экран, который далее был отсканирован. Данные были проанализированы с помощью программы OptiQuant (PerkinElmer, США). Эксперименты выполнены в трех повторениях, определено среднее значение эффективности транскрипции и стандартное отклонение для выборки данных.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе нами была использована экспериментальная система *in vitro*, позволяющая проводить количественный анализ эффективности ЭПВ в физиологических условиях на полинуклеосомных матрицах (рисунок, А) с точно позиционированными нуклеосомами, спонтанно формирующими хроматиновые фибриллы [7, 8]. При этом использовались либо матрицы, на которых нуклеосомы занимали все доступные положения на ДНК (рисунок, А и Д, 13), либо те, на которых отсутствовала одна нуклеосома в различных случайных положениях на ДНК (рисунок, Д, 13-1). Эти матрицы содержали либо интактные гистоны, либо гистон H4, ацетилованный по лизину в положении 16. Степень сборки нуклеосом оценивали с помощью анализа чувствительности участков ДНК, связанных и не связанных с белками, к рестрикционной эндонуклеазе *AluI* (рисунок, Б и В). Наличие и положения разрывов в ДНК определяли методом удлинения праймера.

С использованием разработанной нами ранее транскрипционной системы *in vitro*, позволяющей количественно оценить скорость ЭПВ на хроматиновой матрице (рисунок, Г), было показано, что при неполном насыщении ДНК нуклеосомами (рисунок, Д, матрица 13-1 – отсутствует один гистоновый октамер из тринадцати), наблюдается ингибирующее действие H4K16-Ац на ЭПВ (рисунок, Д и Е, 13-1). Поскольку H4K16-Ац приводит к нарушению контактов положительно заряженного N-концевого участ-

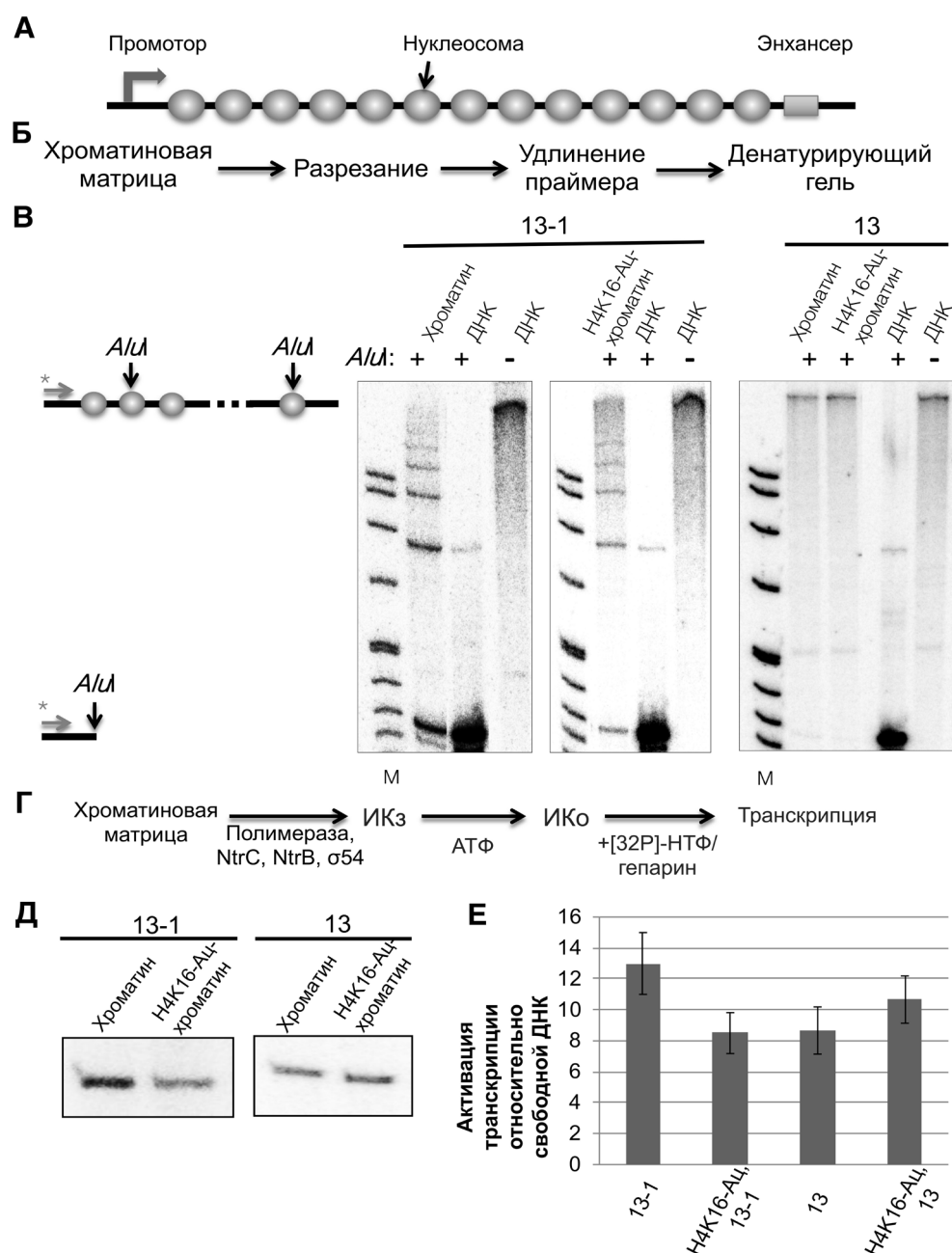


Рисунок. Влияние ацетилирования лизина в 16-м положении гистона H4 (H4K16-Ac) на энхансер-промоторное взаимодействие (ЭПВ) в хроматине. **А** – схема полинуклеосомной транскрипционной матрицы, содержащей энхансер и промотор. **Б** – схема эксперимента по определению качества сборки хроматиновых матриц. Полинуклеосомная матрица, содержащая 13 повторяющихся участков длиной 177 п.н., включающих высокоаффинную к гистонам последовательность 601 (601(177)х13), была собрана на линейаризованной плазмиде и проинкубирована с рестрикционной эндонуклеазой *AluI*. Очищенная ДНК была использована как матрица для удлинения радиоактивно меченого праймера. **В** – характеристика насыщенных нуклеосомных матриц (13) и матриц, в которых отсутствует одна нуклеосома в случайном положении (13-1), методом анализа защиты от эндонуклеазного расщепления рестрикционным ферментом *AluI*. Анализ продуктов реакции удлинения праймера методом электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле. Детекция радиоактивного сигнала с помощью радиочувствительного экрана и системы считывания флуоресценции. **Г** – экспериментальная схема измерения скорости ЭПВ в хроматине *in vitro*. ИКз и ИКо – закрытый и открытый инициаторные комплексы соответственно. **Д** – Действие H4K16-Ac на ЭПВ в хроматине зависит от насыщенности ДНК нуклеосомами. **Е** – количественный анализ транскриптов, показанных на панели Д. Приведены результаты обобщения данных трех независимых экспериментов с указанием стандартного отклонения.

ка H4 с отрицательно заряженным участком H2A/H2B соседней нуклеосомы, происходит нарушение компактной структуры хроматиновой фибриллы. При этом менее выраженное активирующее действие наблюдается на матрицах с более высоким уровнем сборки нуклеосом (рисунок, Д и Е, 13). Полученные результаты согласуются с данными о роли концевых доменов гистонов в поддержании ЭПВ [10].

Свободные от нуклеосом участки ДНК выполняют роль «сустава» и обеспечивают компактной фибрилле хроматина возможность сгибаться, образуя петлю, для поддержания эффективной ЭПВ [9]. Таким образом, структура имеет оптимальные динамические параметры и остается компактной. При ацетилировании H4K16 компактизация хроматина уменьшается, и это ведет к уменьшению скорости ЭПВ (рисунок, Е, 13-1).

При более высоком уровне сборки (рисунок, матрица 13) хроматиновая фибрилла более жесткая, имеет неоптимальные динамические параметры и характеризуется высокой степенью компактизации. При ацетилировании H4K16 степень компактизации нарушается, но вместе с этим, вероятнее всего, увеличивается гибкость фибриллы за счет открывания участков свободной ДНК. Все это приводит к не-

большому активирующему действию H4K16-Ац на ЭПВ при насыщенном уровне сборки хроматина (рисунок, Д и Е, 13). Напомним, что в случае удаления N-концевых участков гистонов на матрице 13 (рисунок, А и Д) ранее наблюдалось ослабление эффективности ЭПВ [2]. При этом теряется не только компактность, но и ряд электростатических взаимодействий внутри фибриллы хроматина, которые, по всей видимости, влияют на поддержание эффективного ЭПВ. Таким образом, H4K16-Ац на матрице 13 вызывает эффект, противоположный тому, который наблюдается при удалении N-концевых участков гистонов.

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что H4K16-Ац оказывает различное действие на ЭПВ в хроматине в зависимости от степени его сборки. Это согласуется с данными *in vivo* [17], показывающими, что H4K16-Ац

локализуется внутри относительно небольших участков активного хроматина, по-видимому, открывая доступ транскрипционным факторам к участкам их связывания, а также придавая хроматиновой фибрилле гибкость, подобную «гибкости сустава», для эффективного ЭПВ. Таким образом, скорость ЭПВ в хроматине может увеличиваться двумя способами — с помощью удаления отдельных нуклеосом [9] и с помощью ацетилирования H4K16-Ац, как показано в настоящей работе.

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. Wasylyk B., Wasylyk C., Chambon P. Short and long range activation by the SV40 enhancer // *Nucleic Acids Res.* 1984. Vol. 12. N 14. P. 5589–5608.
2. Kulaeva O.I., Nizovtseva E.V., Polikanov Y.S., Ulianov S.V., Studitsky V.M. Distant activation of transcription: mechanisms of enhancer action // *Mol. Cell. Biol.* 2012. Vol. 32. N 24. P. 4892–4897.
3. Gilbert N., Boyle S., Fiegler H., Woodfine K., Carter N.P., Bickmore W.A. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers // *Cell.* 2004. Vol. 118. N 5. P. 555–566.
4. Spitz F. Gene regulation at a distance: From remote enhancers to 3D regulatory ensembles // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2016. Vol. 57. P. 57–67.
5. Nizovtseva E.V., Todolli S., Olson W.K., Studitsky V.M. Towards quantitative analysis of gene regulation by enhancers // *Epigenomics.* 2017. Vol. 9. N 9. P. 1219–1231.
6. Rubtsov M.A., Polikanov Y.S., Bondarenko V.A., Wang Y.H., Studitsky V.M. Chromatin structure can strongly facilitate enhancer action over a distance // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. Vol. 103. N 47. P. 17690–17695.
7. Polikanov Y.S., Studitsky V.M. Analysis of distant communication on defined chromatin templates *in vitro* // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 543. P. 563–576.
8. Maeshima K., Rogge R., Tamura S., Joti Y., Hikima T., Szerlong H., Krause C., Herman J., Seidel E., DeLuca J., Ishikawa T., Hansen J.C. Nucleosomal arrays self-assemble into supramolecular globular structures lacking 30-nm fibers // *EMBO J.* 2016. Vol. 35. N 10. P. 1115–1132.
9. Nizovtseva E.V., Clauvelin N., Todolli S., Polikanov Y.S., Kulaeva O.I., Wengrzynek S., Olson W.K., Studitsky V.M. Nucleosome-free DNA regions differentially affect distant communication in chromatin // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45. N 6. P. 3059–3067.
10. Kulaeva O.I., Zheng G., Polikanov Y.S., Colasanti A.V., Clauvelin N., Mukhopadhyay S., Sengupta A.M., Studitsky V.M., Olson W.K. Internucleosomal interactions mediated by histone tails allow distant communication in chromatin // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. N 24. P. 20248–20257.
11. Bone J.R., Lavender J., Richman R., Palmer M.J., Turner B.M., Kuroda M.I. Acetylated histone H4 on the male X chromosome is associated with dosage compensation in *Drosophila* // *Genes Dev.* 1994. Vol. 8. N 1. P. 96–104.
12. Shogren-Knaak M., Ishii H., Sun J.M., Pazin M.J., Davie J.R., Peterson C.L. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions // *Science.* 2006. Vol. 311. N 5762. P. 844–847.
13. Polikanov Y.S., Rubtsov M.A., Studitsky V.M. Biochemical analysis of enhancer-promoter communication in chromatin // *Methods.* 2007. Vol. 41. N 3. P. 250–258.
14. Dann G.P., Liszczak G.P., Bagert J.D., Muller M.M., Nguyen U.T.T., Wojcik F., Brown Z.Z., Bos J., Panchenko T., Pihl R., Pollock S.B., Diehl K.L., Allis C.D., Muir T.W. ISWI chromatin remodellers sense nucleosome modifications to determine substrate preference // *Nature.* 2017. Vol. 548. N 7669. P. 607–611.

15. Polach K.J., Lowary P.T., Widom J. Effects of core histone tail domains on the equilibrium constants for dynamic DNA site accessibility in nucleosomes // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 298. N 2. P. 211–223.

16. Walter W., Studitsky V.M. Construction, analysis, and transcription of model nucleosomal

templates // *Methods.* 2004. Vol. 33. N 1. P. 18–24.

17. Taylor G.C., Eskeland R., Hekimoglu-Balkan B., Pradeepa M.M., Bickmore W.A. H4K16 acetylation marks active genes and enhancers of embryonic stem cells, but does not alter chromatin compaction // *Genome Res.* 2013. Vol. 23. N 12. P. 2053–2065.

Поступила в редакцию 22.05.2019 г.

После доработки 03.08.2019 г.

Принята в печать 02.09.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

EFFECT OF ACETYLATION OF HISTONE H4 ON COMMUNICATION IN CHROMATIN

E.V. Nizovtseva¹, N.S. Gerasimova², V.M. Studitsky^{1, 2, *}

¹*Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA;*

²*Bioengineering Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia*

*e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Long-distance interaction plays an important role in the regulation of eukaryotic genes. Chromatin structure is involved in the process, but the role of histone modifications has not been studied. In the present work the role of acetylation H4K16 (H4K16-Ac) to enhancer-promoter communication (EPC) was analyzed. This modification is associated with euchromatin and is involved in the decompaction of chromatin fibers. We have shown that the effect of H4K16-Ac on EPC *in vitro* depends on the level of chromatin assembly. EPC in chromatin, which lacks nucleosomes at random positions on DNA, is inhibited in the presence of H4K16-Ac. At the same time, EPC in chromatin, in which nucleosomes occupy all available positions on DNA, is somewhat stimulated in the presence of H4K16-Ac.

Keywords: *chromatin, transcription, regulation, enhancers, histones, modifications, acetylation*

Сведения об авторах

Низовцева Екатерина Вячеславовна — канд. биол. наук, науч. сотр. Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). Тел. +1-215-728-7405; e-mail: katrinaniz@gmail.com

Герасимова Надежда Сергеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. 8-495-938-22-91; e-mail: gerasimova@mail.bio.msu.ru

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ; руководитель лаборатории эпигенетики рака Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.043:576.32

**ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *IN VITRO*
ОСТЕОБЛАСТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК MG-63 С ПОВЕРХНОСТЬЮ
СПЛАВОВ СИСТЕМЫ Ti-Zr-Nb, ОБЛАДАЮЩИХ ПАМЯТЬЮ ФОРМЫ****А.С. Солдатенко^{1,*}, М.А. Карачевцева¹, В.А. Шереметьев², А.А. Кудряшова², А.Ю. Архипова^{3,4},
В.А. Андреев⁵, С.Д. Прокошкин², В. Браиловский⁶, М.М. Мойсенович^{3,*}, К.В. Шайтан¹**¹*Кафедра биоинженерии и ³лаборатория конфокальной микроскопии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Россия, 119049, г. Москва, Ленинский проспект, д. 4;*⁴*Московский областной научный клинический институт имени М.Ф. Владимирского, Россия, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2;*⁵*Институт металлургии и материаловедения имени А.А. Байкова РАН, Россия, 119334, г. Москва, Ленинский проспект, д. 49;*⁶*Ecole de Technologie superieure, Canada, 1100, Montreal, Rue Notre-Dame Ouest, QC H3C 1K3
e-mail: an.soldatencko@yandex.ru

В работе изучено влияние поверхности сплавов Ti-Zr-Nb (TZN) с памятью формы на адгезию, пролиферацию, выживаемость и организацию актинового цитоскелета остеобластоподобных клеток MG-63. Исследуемые материалы обладают уникальным сочетанием механических свойств, определяющих их перспективность при создании костных имплантатов с высокой биомеханической совместимостью: низкое значение модуля Юнга и сверхупругое поведение, схожее с поведением костной ткани. В работе использовали тонкие пластины экспериментального сплава TZN и медицинского сплава системы Ti-Al-Nb (TAN) в качестве контрольного. Проведено исследование динамики роста культуры клеток MG-63 с использованием МТТ-теста и подсчета количества ядер на единицу площади. Обнаружено, что на 4-е и 7-е сут количество клеток на сплаве TZN выше, чем на сплаве TAN. Это может быть обусловлено влиянием качественного и количественного состава материалов на микроструктуру и химию поверхности. Доля живых клеток на протяжении времени культивирования на обоих сплавах была близка к 100%. Анализ изображений цитоскелета показал преобладание фибриллярного актина на образцах системы TZN, а также выявил организацию, или структуру, характерную для клеток фибробластоподобной полигональной формы.

Ключевые слова: *остеобластоподобные клетки MG-63, титановые сплавы с памятью формы, поверхность сплавов, термомеханическая обработка, радиально-сдвиговая прокатка, ротационная ковка*

За последнее десятилетие возросло количество работ, посвященных исследованию метастабильных безникелевых сплавов с памятью формы (СПФ) на основе системы Ti-Zr-Nb (TZN) [1]. Титан (Ti) не участвует в метаболических путях и, как следствие, не препятствует нормальному восстановлению поврежденной ткани. Ниобий (Nb) и цирконий (Zr) — безопасные для организма элементы, о чем свидетельствуют результаты исследования их цитотоксичности и аллергенности [2].

СПФ обладают низким значением модуля Юнга, характеризующего способность материала сопротивляться растяжению или сжатию при упругой деформации — примерно 40–60 ГПа, что близко к такой характеристике для кортикального слоя кости (до 30 ГПа) [3]. Кроме того, благодаря обратимому мартенситному превращению $\beta \leftrightarrow \alpha''$, эти сплавы проявляют сверхупругость, то есть способны после больших деформаций (2–6%) восстанавливать близкую к исходной форму (с малой остаточной деформацией) после

снятия нагрузки. Из-за уникальной комбинации свойств, а также отсутствия в составе токсичных компонентов (в частности, никеля [4]), сплавы титана с цирконием и ниобием рассматриваются как наиболее перспективные материалы для изготовления костных имплантатов, применяемых в ортопедии, в частности, балок для систем транспедикулярной фиксации позвоночника.

Эффективным инструментом для управления структурно-фазовым состоянием подобных сплавов является термомеханическая обработка [5]. Она позволяет получить требуемые заготовки для изготовления имплантатов и обеспечить наилучшее сочетание механических и функциональных свойств этих заготовок путем формирования структуры материала. Известно, что комбинированная высокотемпературная термомеханическая обработка, включающая сочетание радиально-сдвиговой прокатки [6] и ротационнойковки позволяет создать высококачественные длинномерные прутковые заготовки из СПФ TZN с однородной внутренней структурой [7].

Восстановление костной ткани вокруг имплантата включает два процесса: дистантный остеогенез, при котором кость формируется со

гового перепада с расходуемым электродом. Полученный слиток подвергали горячему изостатическому прессованию при температуре 900 °С и давлении 100 МПа в течение 2 ч. После обточке слиток диаметром 55 мм подвергли радиально-сдвиговой прокатке до прутка диаметром 12 мм при температуре 900 °С, которую осуществляли в условиях научно-производственного центра кафедры обработки металлов давлением национального исследовательского технологического университета «МИСиС» на мини-станах «14-40» и «10-30». Далее полученные прутки на базе промышленного центра «МАТЭК-СПФ» ковали на ротационно-ковочной машине РКМ-2 до диаметра 6,5 мм таким образом, что основная часть деформации производилась при температуре 600 °С, а заключительные 30% относительной деформации осуществляли при комнатной температуре. Завершающими операциями по подготовке прутка были правка и шлифовка до требуемого диаметра 6 мм. Для формирования полигонизованной субструктуры β -фазы с размером субзерен в нано- и субмикродиапазоне проводили последеформационный отжиг при 550 °С в течение 30 мин с последующим охлаждением в воде [10, 11]. В качестве материала для сравнения был вы-

Таблица

Химический состав исследуемых материалов системы Ti-Zr-Nb (TZN) и Ti-Al-Nb (TAN)

Сплав	Содержание элементов в массовых процентах							
	Ti	Zr	Nb	Al	O	C	N	H
TZN	51,22	28,0	20,7	—	0,05	0,01	<0,01	<0,01
TAN	86,89	—	7,1	5,8	0,18	0,01	<0,01	<0,01

стороны здоровой ткани, и контактный, происходящий *de novo* на поверхности конструкции. Для последнего типа очень важны структурные и физико-химические свойства поверхности имплантата, которые влияют на адгезию, пролиферацию, выживаемость и дифференцировку клеток [8].

Целью данной работы стало изучение биосовместимости и свойств поверхности, сформированной на сплаве системы TZN, в экспериментах *in vitro* с остеобластоподобными клетками MG-63. Были исследованы адгезия, пролиферация, выживаемость и морфология цитоскелета клеток, культивируемых на образцах в виде пластин из материала системы TZN и медицинского титанового сплава TAN (Ti-Al-Nb) в качестве контроля.

Материалы и методы

Получение образцов титанового сплава. Слиток сплава TZN получали методом вакуумно-ду-

бран сплав TAN в виде прутков диаметром 5,5 мм медицинского назначения в соответствии с ASTM (American Society for Testing and Materials) F-1295-11. Химический состав изучаемых материалов представлен в таблице. Для исследований из прутков нарезали образцы в виде таблеток толщиной 1,5 мм. Поверхность полученных образцов подвергали механической шлифовке на абразивной бумаге с величиной зернистости от 320 до 1200. Финишную подготовку поверхности производили с помощью шлифовальных галтовочных абразивных материалов (RFS 03/03 DZ) на центробежной роторной машине ОТЕС в компании «КОНМЕТ» (Россия), производящей медицинские изделия из сплавов титана. Оценку морфологии поверхности сплавов проводили методами оптической микроскопии и измерения шероховатости (параметр R_a) с применением контактного профилометра. Полученные результаты свидетельствуют о том, что образцы имеют одинаковый микрорельеф и шероховатость

($R_a=0,19-0,21$ мкм).

Культивирование остеобластоподобных клеток MG-63 и исследование их взаимодействия с поверхностью пластин из титановых сплавов. В эксперименте использовали непрерывную клеточную линию MG-63 (ATCC® CRL1427™). Клетки получены из остеосаркомы человека и в ответ на внешние сигналы способны к остеогенной дифференцировке.

Образцы из титановых сплавов стерилизовали в течение 10 ч в 70%-ном этиловом спирте, после чего переносили их в лунки 48-луночного планшета со средой EMEM (Eagles Minimum Essential Medium; Lonza, Бельгия) и инкубировали 30 мин. По завершении инкубации заменяли среду в лунках с пластинами на свежую. Процедуру повторяли три раза. Затем помещали образцы в среду EMEM, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) и 1% добавки NEAA (Non-Essential Amino Acids; Lonza, Бельгия) и инкубировали в течение 1 ч. После этого среду из лунок удаляли, вносили по 700 мкл суспензии MG-63 в среде EMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% NEAA, содержащей 15 000 клеток/мл, и культивировали клетки на поверхности пластин. Инкубацию и культивирование клеток проводили при 37 °C в атмосфере с 5% CO₂.

Для исследования динамики роста клеток на 1-е, 4-е и 7-е сут часть образцов фиксировали 4%-ным параформальдегидом (Sigma-Aldrich, Германия) и изучали методом сканирующей микроскопии: выявляли ядра клеток флуоресцентным красителем DAPI (Sigma-Aldrich, Германия) и получали по 10 изображений с ис-

пользованием инвертированного микроскопа Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corporation, Япония). Подсчет количества ядер производили в приложении NIS-Elements Nikon. Часть образцов использовали для проведения МТТ-теста. Для этого на 1-е, 4-е и 7-е сут вносили в лунки с образцами, содержащие 700 мкл полной культуральной среды, по 70 мкл раствора МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) в фосфатно-солевом буфере (5 мг/мл) и инкубировали в течение 4 ч. После этого образцы переносили в ДМСО (диметилсульфоксид; Sigma-Aldrich, Германия) объемом 300 мкл, при аккуратном суспендировании растворяли кристаллы образовавшегося формазана, отбирали супернатант и проводили колориметрические измерения при длине волны 540 нм. Для оценки жизнеспособности использовали метод сканирующей микроскопии. Живые клетки выявляли Syto 9 (Invitrogen, США), инкубируя образцы в 5 мкМ растворе красителя в среде EMEM без сыворотки в течение 1 ч; для возбуждения флуоресценции использовали лазер с длиной волны 488 нм, регистрировали ее в интервале 500–550 нм. Мертвые клетки выявляли по окрашиванию ядер йодидом пропидия (Sigma-Aldrich, Германия): образцы инкубировали 15 мин в среде EMEM без сыворотки с 4 мкМ пропидия йодида; для возбуждения флуоресценции использовали лазер с длиной волны 532 нм, регистрировали ее в интервале 570–620 нм.

На 4-е сут образцы фиксировали 4%-ным параформальдегидом и изучали организацию цитоскелета клеток: выявляли ядра клеток флуоресцентным красителем DAPI (4',6-diamidino-

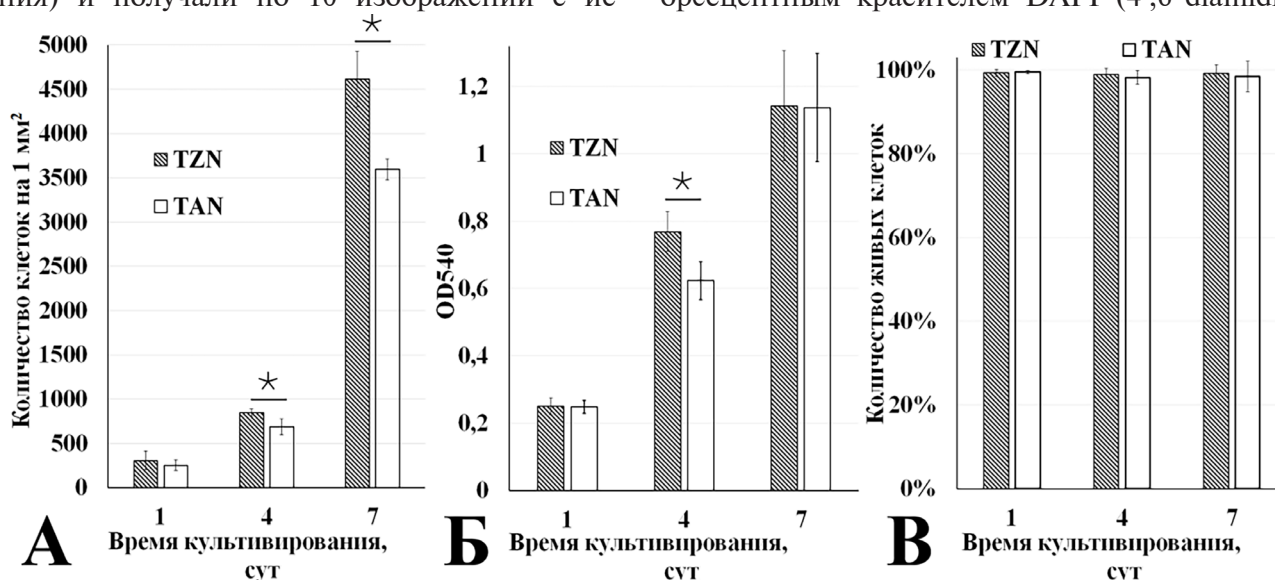


Рис. 1. Взаимодействие остеобластоподобных клеток MG-63 с поверхностью сплавов системы Ti-Zr-Nb (TZN) и Ti-Al-Nb (TAN). А и Б – динамика роста и метаболической активности клеток MG-63 на поверхности образцов: А – результаты количественного подсчета ядер с применением метода сканирующей микроскопии, Б – результаты МТТ-теста. В – Доля живых клеток MG-63 на поверхности экспериментальных образцов (% от общего количества). * – $p < 0,05$

2-phenylindole), инкубируя образцы в течение 5 мин в 300 нМ растворе красителя в фосфатно-солевом буфере; для возбуждения флуоресценции использовали лазер с длиной волны 408

могут отрицательно повлиять на остеоинтеграцию биомедицинской конструкции [12]. Варьирование качественного и количественного состава сплавов на основе титана позволяет создать

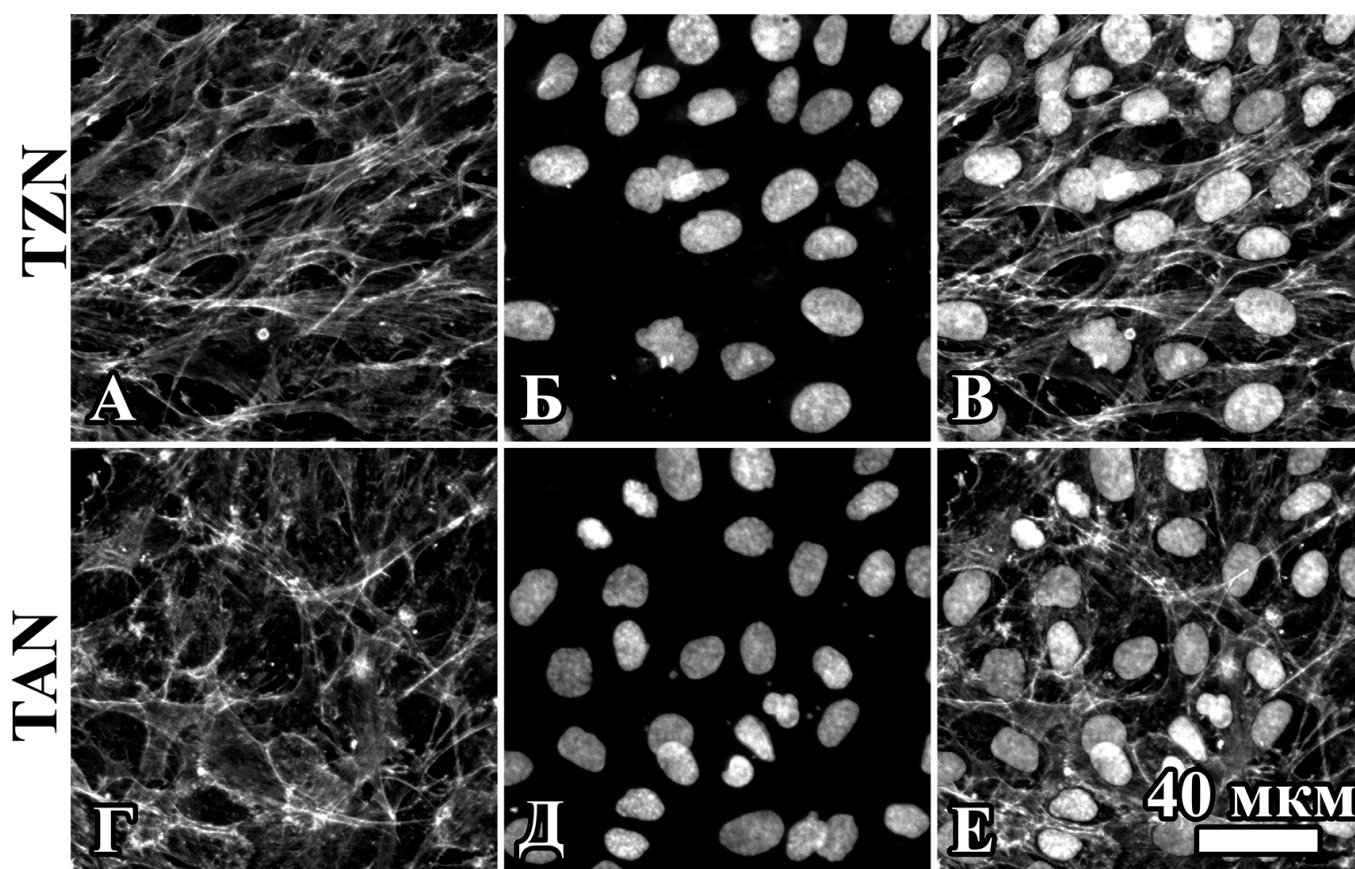


Рис. 2. Изображения остеобластоподобных клеток MG-63, культивируемых на поверхности сплавов системы Ti-Zr-Nb (TZN) и Ti-Al-Nb (TAN), полученные методом сканирующей микроскопии. Верхний ряд – изображения культуры на поверхности сплава TZN, нижний – на поверхности сплава TAN. А и Г – актиновый цитоскелет, выявленный флуоресцентным красителем фаллоидин-Alexa488; Б и Д – ядра, выявленные флуоресцентным красителем DAPI; В и Е – наложение каналов.

нм, регистрировали ее в интервале 425–457 нм. Актиновый цитоскелет выявляли флуоресцентным красителем фаллоидин-Alexa488 (Invitrogen, США), инкубируя образцы 20 мин в 300 нМ растворе красителя в фосфатно-солевом буфере; для возбуждения флуоресценции использовали лазер с длиной волны 488 нм, регистрировали ее в интервале 500–550 нм. Получали по 10 изображений с использованием инвертированного микроскопа Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corporation, Япония). Анализ полученных изображений производили в приложении NIS-Elements Nikon.

Результаты и обсуждение

Последние 40 лет титан остается эталонным материалом для изготовления костных имплантатов. Он практически не вредит организму, однако его физико-химические характеристики

материал, обеспечивающий наилучшее взаимодействие имплантата с клетками и тканями, что повышает эффективность его использования в остеопластике.

Оценку динамики роста остеобластоподобных клеток MG-63 на поверхности образцов титановых сплавов проводили на 1-е, 4-е и 7-е сут культивирования. Применяли два метода: МТТ-тест, данные которого отражают суммарную активность оксидоредуктаз, а также подсчет количества ядер на единицу площади поверхности (рис. 1). На образцах не выявлены признаки клеточной гибели (рис. 2). В противном случае следовало бы говорить о нарушениях адгезии остеобластоподобных клеток на подложке. Аномальная морфология ядра в сочетании с нехарактерной для культуры морфологией цитоскелета и «вспениванием» краев клетки свидетельствуют о прохождении аноиксиса – частного случая апоптоза,

вызванного неправильной адгезией, в том числе к неподходящему субстрату [13].

Анализ данных подсчета ядер показал увеличение их количества на 4-е и 7-е сут для обоих сплавов (рис. 1, А). Достоверное отличие численности клеток на 1-е сут не обнаружено, однако при дальнейшем культивировании количество ядер на единицу площади для образца TZN оказалось больше, чем на контрольном образце TAN. На жизнедеятельность клетки влияет участие элементов сплава в метаболизме [14], его механические свойства [15] и наличие оксидных пленок [16]. Различие используемых в работе материалов состоит в легирующих компонентах. Так, примесные элементы в составе сплава TZN относятся к бета-стабилизаторам, обеспечивающим устойчивость фазы с кубической кристаллической решеткой. В состав сплава TAN примерно в одинаковых количествах входят как бета-стабилизатор ниобий, так и альфа-стабилизатор алюминий, из-за чего микроструктура материала включает в себя кластеры с кубической бета- и гексагональной альфа-структурой и становится более неоднородной [17]. Таким образом, при шлифовке участки поверхности TAN будут отличаться по своим физическим свойствам. В ходе комбинированной термомеханической обработки, включающей радиально-сдвиговую прокатку и ротационную ковку, происходит измельчение и выравнивание по сечению заготовки ее кристаллической структуры [7], а последующий последеформационный отжиг способствует формированию субзерен размером 50–200 нм [4]. Это может быть причиной различия в численности клеток, культивируемых на поверхности исследуемых сплавов. Показано, что остеобласты и остеобластоподобные клетки чувствительны к нанорельефу подложки и лучше пролиферируют на гладкой поверхности [18]. Также возможно отрицательное воздействие алюминия в сплаве TAN. Несмотря на образование защитной оксидной пленки некоторое количество ионов металла выходит с поверхности материала, что может угнетать рост клеток [18]. Это обусловлено способностью алюминия образовывать комплексные соединения с белками и снижать их активность. Другой фактор – антагонизм этого металла по отношению к кальцию, фосфору, магнию и другим элементам, играющим важную роль в физиологии клеток кости. Кроме того, алюминий нарушает процессы фосфорилирования, что негативно сказывается на метаболизме [19]. Полученные результаты подтверждаются данными МТТ-теста (рис. 1, Б): на 4-е сут сигнал для сплава TZN выше, чем для контрольного TAN. Тест LIVE/DEAD показал,

что на протяжении всех 7 сут культивирования доля живых клеток MG-63 близка к 100% (рис. 1, В).

На 4-е сут культивирования было проведено исследование морфологии цитоскелета (рис. 2), по которой можно судить о влиянии механики подложки на живую систему [20], а также предполагать наличие ее остеоиндуктивных свойств [21]. Актиновый цитоскелет клеток на сплаве TZN представлен ярко выраженными фибриллами, пересекающими клетку в различных направлениях (рис. 2, А). Также есть области цитоплазмы, содержащие глобулярный белок. При долговременном культивировании оценить форму и площадь клеток оказалось невозможно, однако организация цитоскелета характерна для мигрирующих клеток полигональной формы ч [21]. На образце TAN выявлены значительное количество глобулярного актина и слабо выраженные фибриллы по краям клетки (рис. 2, Г). Для культуры, претерпевающей остеогенную дифференцировку, характерна полигональная фибробластоподобная форма клеток, а также хорошо различимые длинные стресс-фибриллы продольного направления [23]. Важную роль в физиологии клетки играют процессы образования прочных контактов с субстратом и следующие за ними метаболические изменения – явление механотрансдукции. Так, взаимодействие с поверхностью сплава TZN вызывает перестройки актинового цитоскелета, косвенно указывающие на остеоиндуктивность материала. Это может объясняться повышенным (примерно в три раза) содержанием ниобия. Показано, что этот металл способствует дифференцировке клеток в остеогенном направлении, причем с увеличением его концентрации эффект усиливается [24]. Подобными свойствами обладает и оксид циркония, содержащийся в сплаве TZN [25]. Еще одним объяснением может являться разная концентрация в сплавах легирующих компонентов: в образце TZN их содержание по массе практически равно содержанию титана; в случае TAN основной металл составляет более 80%. С ростом доли примесей механические характеристики титановых сплавов для биомедицинских конструкций улучшаются, в частности, уменьшается величина модуля Юнга, что способствует лучшей адгезии клеток [12].

Таким образом, полученные данные показывают, что свойства поверхности сплава TZN обеспечивают нормальную жизнедеятельность культуры MG-63 и вызывают перестройку актинового цитоскелета по типу мигрирующих фибробластов. Сравнительное исследование показало перспективность новой системы для из-

готовления костных имплантатов для ортопедии.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации: Соглашение о предоставлении субсидии №14.575.21.0158 от 26 сентября 2017 г. (уникальный идентификатор RFMEFI57517X0158).

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета и

на оборудовании центра коллективного пользования Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim H.Y., Fu J., Tobe H., Kim J.I., Miyazaki S. Shape memory and superelasticity // *Shape Mem. Superelasticity*. 2015. Vol. 1. N 2. P. 107–116.
2. Niinomi M., Boehlert C.J. *Advances in metallic biomaterials*. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015. 348 pp.
3. Rho J.Y., Ashman R.B., Turner C.H. Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements // *J. Biomech.* 1993. Vol. 26. N 2. P. 111–119.
4. Magaye R., Zhao J., Bowman L., Ding M. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles // *Exp. Ther. Med.* 2012. Vol. 4. N 4. P. 551–561.
5. Prokoshkin S., Brailovski V., Dubinskiy S., Zhukova Y., Sheremetyev V., Konopatsky A., Inaekyan K. Manufacturing, structure control, and functional testing of Ti–Nb-based SMA for medical application // *Shape Mem. Superelasticity*. 2016. Vol. 2. N 2. P. 130–144.
6. Galkin S.P. Trajectory of deformed metal as basis for controlling radially shifted and screw rolling // *Steel Transl.* 2004. Vol. 7. P. 63–67.
7. Sheremetyev V., Kudryashova A., Cheverikin V., Korotitskiy A., Galkin S., Prokoshkin S., Brailovski V. Hot radial shear rolling and rotary forging of metastable beta Ti-18Zr-14Nb (at.%) alloy for bone implants: microstructure, texture and functional properties // *J. Alloys Compd.* 2019. Vol. 800. P. 320–326.
8. Novaes Jr. A.B., de Souza S.L.S., de Barros R.R.M., Pereira K.K.Y., Iezzi G., Piattelli A. Influence of implant surfaces on osseointegration // *Braz. Dent. J.* 2010. Vol. 21. N 6. P. 471–481.
9. Cvijovic-Alagic I., Cvijovic Z., Bajat J., Rakin M. Composition and processing effects on the electrochemical characteristics of biomedical titanium alloys // *Corros. Sci.* 2014. Vol. 83. P. 245–254.
10. Sheremetyev V., Brailovski V., Prokoshkin S., Inaekyan K., Dubinskiy S. Functional fatigue behavior of superelastic beta Ti-22Nb-6Zr (at%) alloy for load-bearing biomedical applications // *Mater. Sci. Eng. C*. 2016. Vol. 58. P. 935–944.
11. Sheremetyev V., Kudryashova A., Dubinskiy S., Galkin S., Prokoshkin S., Brailovski V. Structure and functional properties of metastable beta Ti-18Zr-14Nb (at.%) alloy for biomedical applications subjected to radial shear rolling and thermomechanical treatment // *J. Alloys Compd.* 2018. Vol. 737. P. 678–683.
12. Chen S., Guo Y., Liu R., Wu S., Fang J., Huang B., Li Z., Chen Zh., Chen Z. Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration // *Colloid Surface B*. 2018. Vol. 164. P. 58–69.
13. Nabavi N., Khandani A., Camirand A., Harrison R.E. Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion // *Bone*. 2011. Vol. 49. N. 5. P. 965–974.
14. Hentze M.W., Muckenthaler M.U., Galy B., Camaschella C. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism // *Cell*. 2010. Vol. 142. N. 1. P. 24–38.
15. Györgyey Á., Ungvári K., Kecskeméti G., Kopniczky J., Hopp B., Oszkó A., Pelsöczy I., Rakonczay Z., Nagy K., Turzó K. Attachment and proliferation of human osteoblast-like cells (MG-63) on laser-ablated titanium implant material // *Mater. Sci. Eng. C*. 2013. Vol. 33. N. 7. P. 4251–4259.
16. Al-Mobarak N.A., Al-Swayih A.A., Al-Rashoud F.A. Corrosion behavior of Ti-6Al-7Nb alloy in biological solution for dentistry applications // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2011. Vol. 6. N 6. P. 2031–2042.
17. Mouseev B.H. Бета-титановые сплавы и перспективы их развития // *МиТОМ*. 1998. Т. 1. № 12. P. 11–14.
18. Anselme K., Linez P., Bigerelle M., Le Maguer D., Le Maguer A., Hardouin P., Hildebrand H.F., Iost A., Leroy J.M. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour // *Biomaterials*. 2000.

Vol. 21. N 15. P. 1567–1577.

19. Шугалей И.В., Гарабаджиу А.В., Илюшин М.А., Сударигов А.М. Некоторые аспекты влияния алюминия и его соединений на живые организмы // Экол. хим. 2012. Т. 21. № 3. С. 168–172.

20. Bonartsev A., Zharkova I., Yakovlev S., et al. 3D-scaffolds from poly(3-hydroxybutyrate) poly(ethylene glycol) copolymer for tissue engineering // J. Biomater. Tissue Eng. 2016. Vol. 6. N 1. P. 42–52.

21. Ozdemir T., Higgins A.M., Brown J.L. Osteoinductive biomaterial geometries for bone regenerative engineering // Curr. Pharm. Des. 2013. Vol. 19. N. 19. P. 3446–3455.

22. Goncharenko A., Malyuchenko N., Moisenovich A., Kotlyarova M., Arkhipova A., Kon'kov A., Agapov I., Molochkov A., Moisenovich M., Kirpichnikov M. Changes in morphology of actin filaments and

expression of alkaline phosphatase at 3D cultivation of MG-63 osteoblast-like cells on mineralized fibroin scaffolds // Dokl. Biochem. Biophys. 2016. Vol. 470. N 1. P. 368–370.

23. Rottmar M., Lischer S., Pleskova M., Bruinink A., Maniura-Weber K. Correlating cell architecture with osteogenesis: first steps towards live single cell monitoring // Eur. Cells Mater. 2009. Vol. 18. N 18. P. 59–62.

24. Maya A.E.A., Grana D.R., Hazarabedian A., Kokubu G.A., Luppo M.I., Vigna G. Zr-Ti-Nb porous alloys for biomedical application // Mater. Sci. Eng. C. 2012. Vol. 32. N 2. P. 321–329.

25. Sollazzo V., Palmieri A., Pezzetti F., Bignozzi C.A., Argazzi R., Massari L., Brunelli G., Carinci F. Genetic effect of zirconium oxide coating on osteoblast-like cells // J. Biomed. Mater. Res. – Part B Appl. Biomater. 2008. Vol. 84. N 2. P. 550–558.

Поступила в редакцию 08.07.2019 г.

После доработки 10.09.2019 г.

Принята в печать 17.09.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

THE INTERACTION PECULIARITIES IN VITRO OF OSTEOBLAST-LIKE CELLS MG-63 WITH SURFACE OF Ti-Zr-Nb SHAPE MEMORY ALLOY

A.S. Soldatenko^{1,*}, M.A. Karachevtseva¹, V.A. Sheremetyev², A.A. Kudryashova², A.Yu. Arkhipova^{3,4}, V.A. Andreev⁵, S.D. Prokoshkin², V. Brailovski⁶, M.M. Moisenovich^{3,*}, K.V. Shaitan¹

¹Department of Bioengineering and ³Laboratory of Confocal Microscopy, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, Moscow, 119234, Russia;

²National Research Technological University «MISiS», Leninsky Prospekt 4, Moscow, 119049, Russia;

⁴M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute «MONIKI», Schepkina ul. 61/2, Moscow, 129110, Russia;

⁵A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Leninsky Prospekt 49, Moscow, 119334, Russia;

⁶Ecole de Technologie Supérieure, 1100 Rue Notre-Dame Ouest, Montréal, QC H3C 1K3, Canada
*e-mail: an.soldatencko@yandex.ru

The paper studies the influence of the Ti-Zr-Nb (TZN) shape memory alloys surface on adhesion, proliferation, viability and actin cytoskeleton organization of osteoblast-like cells MG-63. The studied materials have a unique combination of mechanical properties that determine their prospects for creating bone implants with high biomechanical compatibility: low value of the Young's modulus and superelastic behavior, similar to the behavior of bone tissue. We used thin plates of the experimental alloy TZN and the Ti-Al-Nb medical alloy (TAN) as a control material. A study of the growth dynamics of the MG-63 cell culture was made using the MTT test and counting the number of nuclei per unit area using scanning microscopy. It was found that on 4 and 7 days the number of cells on the TZN alloy is higher than on the TAN alloy. This may be due to the influence of the qualitative and quantitative composition of materials on the surface microstructure and chemistry. The viability over the

cultivation time was close to 100% on both alloys. The analysis of cytoskeleton images showed the predominance of fibrillary actin on samples of the TZN system, as well as the organization characteristic of fibroblast-like polygonal cells.

Keywords: *costeoblast-like cells MG-63, titanium shape memory alloys, alloys surface, thermomechanical treatment, radial shear rolling, rotary forging*

Сведения об авторах

Солдатенко Анна Сергеевна — студент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: an.soldatencko@yandex.ru

Карачевцева Маргарита Алексеевна — студент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: margarita.karachevtseva@gmail.com

Шереметьев Вадим Алексеевич — канд. тех. наук, ст. науч. сотр., доцент кафедры обработки металлов давлением НИТУ «МИСиС». Тел.: 8-495-638-44-05; e-mail: sheremetyev@misis.ru

Кудряшова Анастасия Александровна — аспирант НИТУ «МИСиС», инженер Научно-образовательного Центра «Наноматериалов и нанотехнологий» НИТУ «МИСиС». Тел.: 8-495-955-00-32; e-mail: kudryashova@misis.ru

Архипова Анастасия Юрьевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории ГБУЗ МО «МОНИКИ имени М.Ф. Владимирского». Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: anastasia-yu-arkhipova@yandex.ru

Андреев Владимир Александрович — канд. техн. наук, ст. науч. сотр. лаборатории пластической деформации металлических материалов ИМЕТ РАН. Тел.: 8-499-135-86-51; e-mail: andreev.icmateks@gmail.com

Прокошкин Сергей Дмитриевич — докт. физ.-мат. наук, проф., гл. науч. сотр. кафедры обработки металлов давлением НИТУ «МИСиС». Тел.: 8-495-638-44-05; e-mail: prokoshkin@tmo.misis.ru

Браиловский Владимир — канд. техн. наук, проф. Высшей технологической школы. Тел.: +1-514-396-85-94; e-mail: vbrailovski@mec.etsmtl.ca

Мойсенович Михаил Михайлович — канд. биол. наук, зав. лабораторией конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: mtoisenovich@mail.ru

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 581.13

УГЛЕКИСЛОТНЫЙ ГАЗООБМЕН ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ В УРБАНИЗИРОВАННЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

А.К. Юзбеков^{1, *}, У. Цзусюнь²¹Кафедра общей экологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Биологический факультет, Университет МГУ–ППИ в Шэньчжэне, 518172, КНР, пров. Гуандун, г. Шэньчжэнь, р-н Лунган, ул. Жуи, д. 299

*e-mail: uak2003@mail.ru

В условиях увеличения содержания углекислого газа в атмосфере изучение всех составляющих углеродного баланса в биосфере является актуальным. В статье представлены результаты исследований углекислотного газообмена хвой ели европейской (*Picea abies* L.) и псевдотсуги Мензиса (*Pseudotsuga menziesii* L.) в урбанизированной среде (на примере Москвы). Установлено, что осеннее потепление в 2018 г. способствовало продлению периода поглощения углекислого газа хвойными деревьями. Путем анализа влияния факторов внешней среды на фотосинтетическую активность хвой выявлено, что интенсивность фотосинтеза определялась только уровнем освещенности. Повышение температуры атмосферного воздуха в полуденные часы не влияло на интенсивность фотосинтеза, что, вероятно, связано с адаптацией растений к низким температурам воздуха в ночные и утренние часы. На основе регрессионного анализа определено, что зависимость ассимиляции CO₂ от освещенности имела вид логарифмической кривой (коэффициент достоверности аппроксимации R² равен 0,8). Выявлена видовая специфичность реакции фотосинтеза хвойных деревьев на экологические условия в осенний период: наибольшей устойчивостью к факторам внешней среды обладала ель европейская, фотосинтетическая активность которой была в 1,4 раза выше по сравнению с псевдотсугой Мензиса. Согласно расчетам, величина ассимиляции CO₂ у ели европейской и псевдотсуги Мензиса превышала уровень светового дыхания соответственно в 3,6 и 2,7 раза, что свидетельствует о положительном углекислотном газообмене и существенной роли хвойных деревьев в регулировании углеродного баланса урбанизированной экосистемы.

Ключевые слова: фотосинтез, дыхание, хвойные деревья, урбанизированная среда, температура воздуха, освещенность, углекислотный газообмен

В последние десятилетия динамика экологических показателей свидетельствует об ухудшении экологической ситуации в городах, что, в немалой степени, обусловлено увеличением техногенного воздействия на окружающую среду. В этих условиях одним из факторов оптимизации городской среды является использование древесных насаждений.

Согласно результатам исследования [1], для городов умеренного пояса наиболее значимыми по числу предоставляемых услуг определены территории с древесной растительностью. Парки и городские насаждения являются важной частью городского ландшафта. Существуют четыре основные функции парковых деревьев, которые

имеют существенные последствия для качества окружающей среды и здоровья человека: влияние на температуру воздуха в парках и вблизи них; влияние на концентрацию загрязняющих веществ; защита от ультрафиолетового излучения и изменение климата.

Зеленые насаждения изменяют микроклимат в городской среде. Парки обычно имеют более низкую температуру воздуха, чем прилегающие районы [2]. Измерения показали, что разница может составлять около 7 °С. Во время жары, которая губительна для сотен людей, парковые зоны предоставляют горожанам комфортные условия для отдыха.

В условиях города деревья в парках умень-

шают загрязнение воздуха путем удаления вредных веществ, поступающих в атмосферу от промышленных предприятий и транспорта. Исследования во многих городах США и Европы показали, что в среднем один гектар городских древесных насаждений улавливает 10 кг загрязнений в год [3].

Одной из функций городских насаждений является уменьшение количества ультрафиолетового излучения (листья деревьев поглощают около 95% излучения). Оценка влияния деревьев на интенсивность УФ-излучения в различных зонах землепользования в Сеуле, проведенная на основе математической модели, показала, что коэффициент УФ-защиты для пешеходов в солнечный полдень имеет наибольшее значение для парков, под пологом деревьев [4].

Особая роль парковых деревьев заключается в их влиянии на изменение климата. В настоящее время, в условиях увеличения содержания углекислого газа в атмосфере, большое значение имеет изучение всех составляющих углеродного баланса в биосфере. Влияние парковых деревьев на уровень CO_2 в атмосфере связано с двумя особенностями: поглощение в процессе фотосинтеза углекислого газа, выбрасываемого в атмосферу городов промышленными производствами и автотранспортом, и запасание его в фитомассе; выделение углекислого газа в результате разложения растительности [5, 6]. По данным авторов [7], только в городских лесах центральной части Пекина в виде фитомассы запасается около 0,2 млн. т двуокиси углерода. Поэтому весьма важно при подборе древесных растений в насаждениях городов учитывать их участие в углеродном балансе атмосферы. Однако в научной литературе эти вопросы отражены недостаточно полно. Вследствие этого исследование углекислотного газообмена древесных растений в условиях городской среды является актуальным, поскольку результаты позволяют оценить их вклад в углеродный баланс атмосферы в зависимости от видоспецифической реакции фотосинтетической активности на факторы внешней среды.

Цель исследований – оценка углекислотного газообмена хвои ели европейской (*Picea abies* L.) и псевдотсуги Мензиса (*Pseudotsuga menziesii* L.) в урбанизированной среде (на примере Москвы).

Материалы и методы

Исследования фотосинтетической и дыхательной активности древесных растений проводили в г. Москве на территории Ботанического сада Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Эксперименты выполняли на примере двух

видов хвойных деревьев – ели европейской (*Picea abies* L.) и псевдотсуги Мензиса (*Pseudotsuga menziesii* L.).

CO_2 -газообмен регистрировали с 3 по 26 октября 2018 г., в полуденные часы, в наиболее благоприятных для процесса фотосинтеза условиях освещения и температуры. Измерения проводили в трех повторностях, с интервалом 10 мин. Длительность экспозиции на каждом побеге при измерении, как фотосинтеза, так и дыхания, составляла 90 с.

Интенсивность нетто-фотосинтеза и светового дыхания (выделение CO_2 на свету в результате фото- и темнового дыхания) определяли газометрическим методом (метод закрытых камер), с помощью специально сконструированного на биологическом факультете МГУ комплекта оборудования [8].

Для расчета изменения массы CO_2 в камере использовали формулу, основанную на уравнении Менделеева – Клайперона:

$$\text{DCO}_2 = (44 \cdot 10^{-6} \cdot \text{DM} \cdot \text{P} \cdot \text{V}) / (8,314 \cdot \text{T}),$$

где DCO_2 – изменение массы CO_2 в камере, г CO_2 ; 44 – молярная масса CO_2 , г $\text{CO}_2 \cdot \text{моль}^{-1}$; 10^{-6} – пересчетный коэффициент из ppm в объемные доли, ppm $^{-1}$; DM – изменение концентрации CO_2 в камере, ppm; P – атмосферное давление, Па; V – объем камеры, м 3 ; 8,314 – универсальная газовая постоянная, Па $\cdot \text{м}^3 \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$; T – температура воздуха, °K.

Интенсивность фотосинтеза и световое дыхание хвои определяли в мг CO_2 /г сухой массы $\cdot \text{ч}$, поскольку расчет на сухую массу позволяет сравнивать величины ассимиляции и эмиссии CO_2 , характеризующие эффективность воспроизводства и разложения растениями органического вещества. Сухую массу хвои определяли путем высушивания в термостате при 105 °C в течение 8 ч. Масса считалась постоянной, если расхождение в массе образцов двух последовательных взвешиваний не превышало 0,1%.

Для выявления зависимости составляющих углекислотного газообмена от факторов внешней среды при каждом измерении определяли температуру атмосферного воздуха и освещенность вблизи камеры, в которой находились интактные побеги модельных деревьев, на высоте 1,5–2 м. Для измерения температуры использовали электронный термометр Hanna HI98509 Chektemp 1 (Hanna Instruments, Германия), освещенности – цифровой люксметр Mastech MS6610 (Precision Mastech Enterprises Company, Гонконг).

Статистическую обработку данных проводили с использованием методов регрессионного и корреляционного анализа.

Результаты и обсуждение

Погодные условия в октябре 2018 г. способствовали продолжительности фотосинтетической активности хвойных деревьев в Ботаническом саду МГУ. Данные о продлении вегетационного периода хвойных деревьев осенью, в связи с потеплением климата, получены и другими авторами [9].

Октябрь был теплым месяцем: среднемесячная температура воздуха составила $+7,5^{\circ}\text{C}$, максимальная — $(+19,7^{\circ}\text{C})$. Особенно теплой была вторая декада месяца (средняя температура воздуха равнялась $+11,5^{\circ}\text{C}$). Отрицательные значения температуры воздуха зарегистрированы с 29 по 31 октября. Количество осадков — 49 мм. Средняя температура воздуха в полуденные часы составила $+11,2^{\circ}\text{C}$ при оптимальной относительной влажности воздуха 66%.

В осенний период вегетации фотосинтетическая активность хвойных растений снижается. По мнению некоторых авторов [10], уменьшение фотосинтетической активности осенью связано с разрушающим воздействием температуры на фотосинтетический аппарат растений (охлаждение хвои приводит к значительному сокращению общего содержания хлорофилла). Исследования, проведенные в Массачусетсе (США), показали, что минимальная температура воздуха ниже -2°C в течение предыдущих 24 ч оказывала негативное влияние на полуденную ассимиляцию CO_2 у тсуги канадской [11].

В нашем исследовании отрицательные температуры воздуха в период проведения экспериментов отсутствовали. Кратковременное понижение температура воздуха до $+0,3$ и $+0,1^{\circ}\text{C}$ отмечено в ночные часы 9 и 26 октября, при этом средняя минимальная температура в октябре составила $+5,5^{\circ}\text{C}$, в наиболее теплую вторую декаду — $(+7,5^{\circ}\text{C})$. Результаты показали, что повышенная температура воздуха в октябре продлила период поглощения углекислого газа хвойными деревьями. Согласно расчетам, значения интенсивности фотосинтеза ели европейской изменялись в интервале от 0,08 до $3,06 \text{ мг CO}_2/\text{г сухой массы} \cdot \text{ч}$ (соответственно 3 и 22 октября) при среднем значении, равном $1,60 \text{ мг CO}_2/\text{г сухой массы} \cdot \text{ч}$ (рис. 1А). Минимальное и максимальное значения ассимиляции CO_2 у псевдотсуги Мензиса составили 0,48 и $2,52 \text{ мг CO}_2/\text{г сухой массы} \cdot \text{ч}$ (3 и 9 октября); среднее

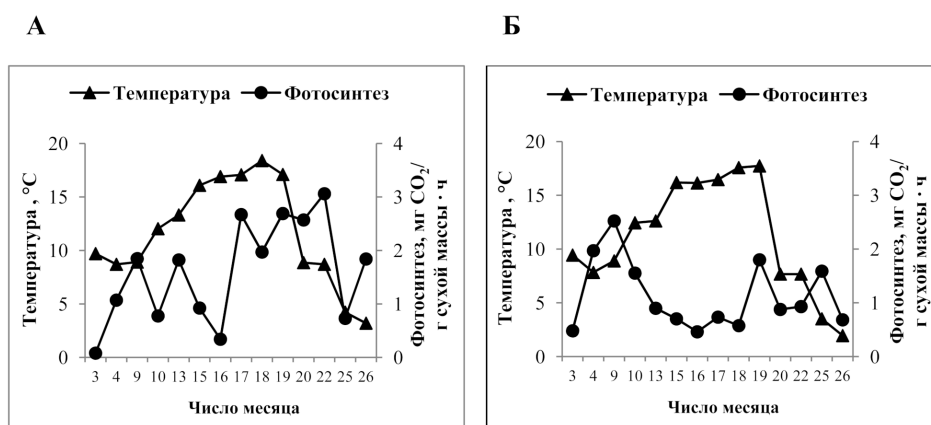


Рис.1. Динамика интенсивности фотосинтеза у хвойных деревьев (А — ель европейская, Б — псевдотсуга Мензиса) и температуры воздуха в октябре 2018 г.

значение равнялось $1,13 \text{ мг CO}_2/\text{г сухой массы} \cdot \text{ч}$ (рис. 1Б). Таким образом, фотосинтетическая активность ели европейской в 1,4 раза превышала аналогичный показатель псевдотсуги Мензиса, что свидетельствует о видовой специфичности поглощения CO_2 хвойными деревьями в осенний период в условиях города.

Температура атмосферного воздуха является одним из основных экологических факторов, определяющих процесс фотосинтеза древесных растений. Известно, что общая зависимость фотосинтеза от температуры выражается одновершинной кривой; при изменении температуры в интервале от минимального до оптимального значения между показателями существует прямая зависимость. Однако для хвойных деревьев, участвующих в нашем эксперименте, такая связь не установлена: графику повышения температуры воздуха в полуденные часы во второй декаде октября соответствовала зигзагообразная хаотичная кривая изменения интенсивности фотосинтеза (рис. 1). Вероятно, это можно объяснить адаптацией растений к низким температурам воздуха в ночные и утренние часы, препятствующей увеличению фотосинтетической активности хвои при дневном прогреве воздуха, а также влиянием на процесс фотосинтеза других факторов.

Исследования, проведенные в Норвегии [12], также показали отсутствие связи между повышенной температурой воздуха и фотосинтезом в осенний период: ассимиляция CO_2 у ели обыкновенной оставалась постоянной при увеличении на 4°C средней еженедельной температуры воздуха (если она была больше 8°C).

Свет является фактором, который определяет жизнедеятельность растений, в том числе скорость поглощения CO_2 при фотосинтезе. Согласно результатам, полученным при измерении интенсивности фотосинтеза ели европейской, освещенность находилась в интервале от 0,9 до

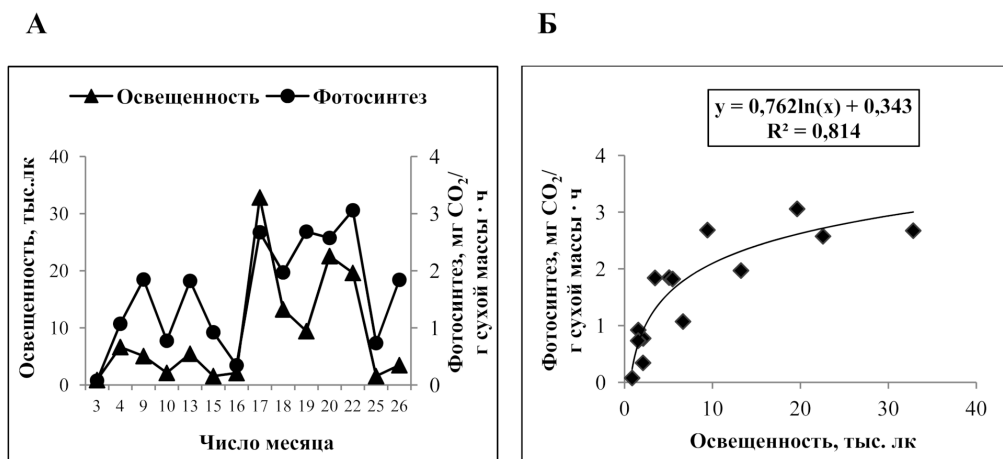


Рис. 2. Зависимость интенсивности фотосинтеза хвой ели европейской от освещенности в октябре 2018 г.: А — динамика интенсивности фотосинтеза и освещенности; Б — уравнение связи интенсивности фотосинтеза и освещенности

32,8 тыс. лк (3 и 17 октября) (рис. 2А). Этим значениям соответствовали минимум и один из максимумов фотосинтетической активности. Методом регрессионного анализа связи ассимиляции CO₂ и освещенности выявили логарифмическую зависимость между показателями (рис. 2Б). Коэффициент достоверности аппроксимации R², равный 0,814, показывает высокую степень соответствия трендовой модели исходным данным.

Динамика интенсивности фотосинтеза хвой псевдотсуги Мензиса и освещенности представлена на рис. 3А. Максимальное значение фото-

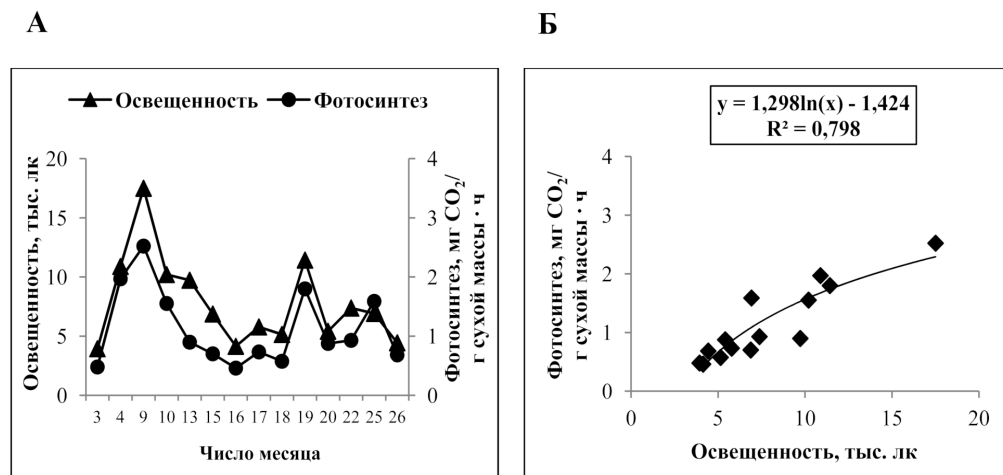


Рис. 3. Зависимость интенсивности фотосинтеза хвой псевдотсуги Мензиса от освещенности в октябре 2018 г.: А — динамика интенсивности фотосинтеза и освещенности; Б — уравнение связи интенсивности фотосинтеза и освещенности

синтеза наблюдалось 9 октября при освещенности, равной 17,5 тыс. лк, минимальное — 3 октября, при освещенности в 3,9 тыс. лк. При этом зависимость интенсивности фотосинтеза псевдотсуги Мензиса от освещенности определялась логарифмической кривой; коэффициент

достоверности аппроксимации R² равен 0,798 (рис. 3Б).

Зависимость интенсивности фотосинтеза от содержания CO₂ в атмосфере для исследуемых хвойных деревьев выявлена не была.

Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что, в осенний период в условиях городской среды полуденная интенсивность CO₂-ассимиляции у хвойных деревьев определялась, в основном, уровнем освещенности.

В связи с этим, существенные различия в интенсивности фотосинтеза хвой исследуемых деревьев, наблюдаемые во второй половине октября, вероятно, обусловлены более высокими значениями освещенности при проведении измерений ассимиляции CO₂ у ели европейской.

Параллельно с изменением интенсивности фотосинтеза повышался или понижался уровень дыхания. Согласно расчетам, минимальное и максимальное значения светового дыхания у ели европейской составили 0,08 и 1,0 мг CO₂/г сухой массы · ч (20 и 15 октября) (рис. 4А); у псевдотсуги Мензиса — 0,09 и 0,78 мг CO₂/г сухой массы · ч (22 и 13 октября) (рис. 4Б). В результате регрессионного анализа связи светового дыхания и температуры атмосферного воздуха установили, что между показателями существует прямая линейная связь (коэффициент детерминации R² для ели европейской и псевдотсуги Мензиса составил соответственно 0,552 и 0,335).

Одной из основных задач при изучении углекислотного газообмена хвойных деревьев являлось получение количественной характеристики взаимосвязи между фотосинтезом и дыханием, позволяющей оценить роль растений в углеродном балансе урбанизированной экосистемы.

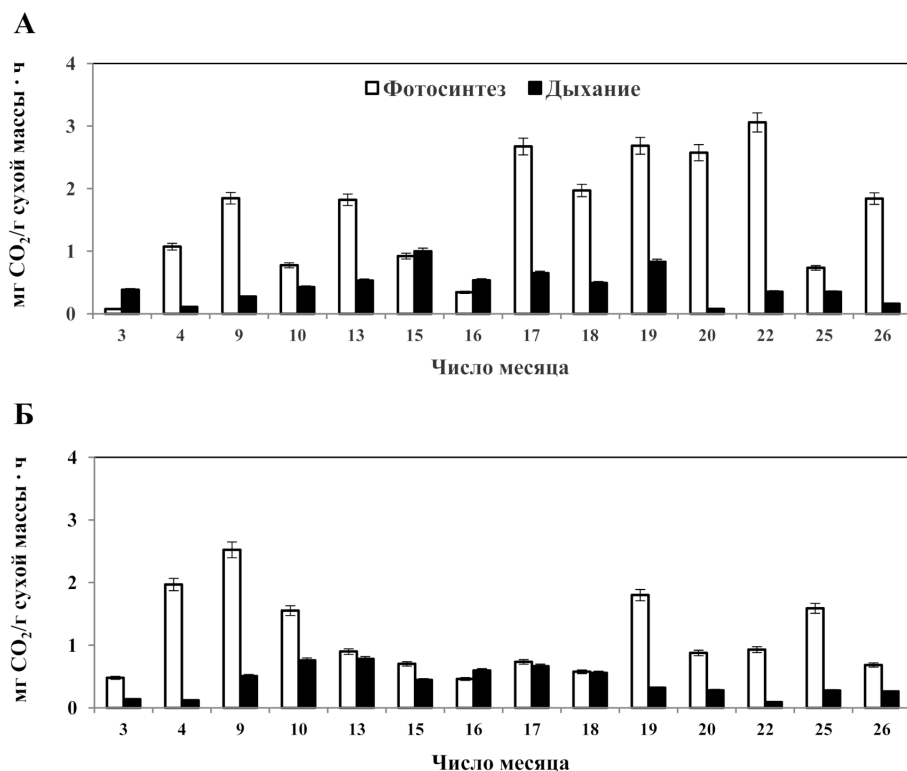


Рис. 4. Динамика интенсивности фотосинтеза и светового дыхания у хвойных деревьев (А — ель европейская; Б — псевдотсуга Мензиса) в октябре 2018 г.

Как следует из рис. 4, полуденные величины интенсивности фотосинтеза и светового дыхания в течение периода наблюдений находились в прямой зависимости; исключение составили 15 и 16 октября — для ели европейской и 16 октября — для псевдотсуги Мензиса, когда световое дыхание было больше ассимиляции CO₂. Вероятно, это связано с тем, что метеорологические условия в эти дни характеризовались низким уровнем освещенности, который обусловил низкие значения фотосинтеза, и достаточно высокой температурой воздуха (около 17 °C) — благоприятным фактором для светового дыхания.

В октябре среднее значение светового дыхания ели европейской и псевдотсуги Мензиса составило 0,44 и 0,42 мг CO₂/г сухой массы · ч. Следовательно, интенсивность фотосинтеза превышала уровень дыхания соответственно в 3,6 и 2,7 раза, что свидетельствует о положительном

углекислотном газообмене хвойных деревьев в урбанизированной среде.

Таким образом, проведенное исследование показало, что теплые погодные условия в октябре 2018 г. способствовали продлению периода поглощения углекислого газа хвойными деревьями, произрастающими на территории Ботанического сада МГУ. Выявлена видовая специфичность реакции фотосинтетического аппарата хвойных пород на экологические условия в осенний период: интенсивность CO₂-ассимиляции у ели европейской, равная 1,60 мг CO₂/г сухой массы · ч, была в 1,4 раза выше по сравнению с этим показателем для псевдотсуги Мензиса. Повышение температуры атмосферного воздуха в полуденные часы не влияло на интенсивность фотосинтеза хвои, что, вероятно, связано с адаптацией растений к низким температурам

воздуха, характерным для осеннего периода, и переходом к состоянию покоя. Интенсивность фотосинтеза хвои определялась только уровнем освещенности, при этом зависимость между показателями имела вид логарифмической кривой. Световое дыхание хвои находилось в прямой линейной зависимости от температуры атмосферного воздуха. Положительный углекислотный газообмен хвои ели европейской и псевдотсуги Мензиса, интенсивность CO₂-ассимиляции у которых превышала уровень дыхания соответственно в 3,6 и 2,7 раза, свидетельствует о существенной роли исследуемых пород деревьев в оптимизации городской среды.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Endreny T., Santagata R., Perna A., De Stefano C., Rallo R.F., Ulgiati S. Implementing and managing urban forests: A much needed conservation strategy to increase ecosystem services and urban wellbeing // *Ecol. Model.* 2017. Vol. 360. P. 328–335.
2. Hamada S., Ohta T. Seasonal variations in the cooling effect of urban green areas on surrounding urban areas // *Urban For. Urban Green.* 2010. Vol.9. N 1. P. 15–24.
3. Baro F., Chaparro L., Gomez-Baggethun E., Langemeyer J., Nowak D.J., Terradas J. Contribution

of ecosystem services to air quality and climate change mitigation policies: the case of urban forests in Barcelona, Spain // *Ambio*. 2014. Vol. 43. N 4. P. 466–479.

4. Na H.R., Heisler G.M., Nowak D.J., Grant R.H. Modeling of urban trees' effects on reducing human exposure to UV radiation in Seoul, Korea // *Urban For. Urban Green*. 2014. Vol. 13. N 4. P. 785–792.

5. Long S.P., Ainsworth E.A., Rogers A., Ort D.R. Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. Vol. 55. P. 591–628.

6. Nowak D.J., Stevens J.C., Sisinni S.M., Luley C.J. Effects of urban tree management and species selection on atmospheric carbon dioxide // *J. Arboric.* 2002. Vol. 28. N 3. P. 113–122.

7. Yang J., McBride J., Zhou J., Sun Z. The urban forest in Beijing and its role in air pollution reduction // *Urban For. Urban Green*. 2005. Vol. 3. N 2. P. 65–78.

8. Yuzbekov A.K., Zamolodchikov D.G.,

Ivashchenko A.I. Spruce fir photosynthesis in the forest ecosystems of the Log Tayezhnyi test area // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 4. P. 169–172.

9. Chang C.Y., Fréchet E., Unda F., Mansfield S.D., Ensminger I. Elevated temperature and CO₂ stimulate late-season photosynthesis but impair cold hardening in Pine // *Plant Physiol.* 2016. Vol. 172. N 2. P. 802–818.

10. Lundmark T., Bergh J., Strand M., Koppel A. Seasonal variation of maximum photochemical efficiency in boreal Norway spruce stands // *Trees*. 1998. Vol. 13. N 2. P. 63–67.

11. Hadley J.L. Effect of daily minimum temperature on photosynthesis in Eastern hemlock (*Tsuga canadensis* L.) in autumn and winter // *Arct. Antarct. Alp. Res.* 2000. Vol. 32. N 4. P. 368–374.

12. Stinziano J.R., Hüner N.P.A., Way D.A. Warming delays autumn declines in photosynthetic capacity in a boreal conifer, Norway spruce (*Picea abies*) // *Tree Physiol.* 2015. Vol. 35. N 12. P. 1303–1313.

Поступила в редакцию 27.07.2019 г.

После доработки 10.09.2019 г.

Принята в печать 17.09.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

CARBON DIOXIDE EXCHANGE OF ARBOREAL PLANTS IN URBAN ECOSYSTEMS

A.K.Yuzbekov^{1,*}, W. Zuxun²

¹Department of General Ecology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiy gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Faculty of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, Ruyi Rd. 299, Longgang district, Shenzhen, Guangdong province, 518172, PRC

*e-mail: uak2003@mail.ru

Research on all factors that contribute to the carbon balance in the biosphere is of paramount importance, owing to the current increase in air carbon dioxide content. This work presents data on the carbon dioxide exchange of the needles of the common spruce (*Picea abies* L.) and the douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* L.) in an urban environment as exemplified by Moscow. It was established that a warm spell in autumn contributed to the prolongation of the period of carbon dioxide uptake by coniferous trees. Our analysis of the impact of environmental factors on needle photosynthetic activity revealed that photosynthesis intensity only depends on the illumination level. The midday increase in air temperature failed to affect photosynthesis intensity, probably because the plants were adapted to low night and morning air temperatures. According to the regression analysis data obtained, the dependence of CO₂ assimilation on illumination represented a logarithmic curve; the approximation validity coefficient (R²) being 0.8. The impact of environmental conditions on conifer photosynthesis in autumn proved to be species-specific. The

common spruce exhibited the maximum resistance to environmental factors, and its photosynthetic activity was 1,4 fold higher than that of the douglas-fir. Calculations revealed that the CO₂ assimilation level in the common spruce and the douglas-fir exceeded the light respiration level 3,6- and 2,7-fold, respectively, which points to a positive carbon dioxide exchange “balance sheet” and highlights the important role of coniferous trees in regulating the carbon balance of an urban ecosystem.

Keywords: *photosynthesis, respiration, coniferous trees, urban environment, air temperature, illumination, carbon dioxide exchange*

Сведения об авторах

Юзбеков Ахмед Кадималиевич — докт. биол. наук, проф. кафедры общей экологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-52-54; e-mail: uak2003@mail.ru

Цзусюнь У — магистр биологического факультета Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне. Тел.: +86-13581585864; e-mail: wuzx009@163.com

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 57.087:[576.53+57.032]

ДЕМОГРАФИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ СТАРЕНИЯ НА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

А.Н. Хохлов*, Г.В. Моргунова, А.А. Клебанов

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

Стареющие организмы вымирают в соответствии с «законом Гомпертца», т.е. вероятность их смерти увеличивается с возрастом. Построение кривых выживания является основным инструментом геронтологов, позволяющим изучать старение и тестировать геропротекторные препараты. Анализ кривых выживания включает в себя получение целого ряда показателей, характеризующих старение популяции — например, средняя и максимальная продолжительность жизни, сила смертности, темп старения. Тестирование геропротекторов можно корректно производить лишь с помощью получения таких кривых. Вымирание стационарных клеточных популяций — бактерий, дрожжей, клеток млекопитающих в культуре — также происходит в соответствии с уравнением Гомпертца. В связи с этим целесообразно использовать построение кривых выживания и их анализ для изучения «старения» непересеваемых культур клеток и тестирования на них геропротекторных препаратов. Мы использовали этот подход в наших собственных экспериментах, благодаря чему смогли обнаружить положительное геропротекторное влияние препарата «Квинтон» на культуру «стационарно стареющих» клеток китайского хомячка.

Ключевые слова: *кривые выживания, закон Гомпертца, продолжительность жизни, клеточное старение, «стационарное старение», геропротекторы*

На сегодняшний день построение кривых выживания когорт животных/людей является наиболее надежным способом оценки эффективности влияния физических факторов или биологически активных соединений на процесс старения. Именно этот показатель, а не проявление биомаркёров возраста (которыми так увлеклись многие исследователи) действительно позволяет видеть, как происходит старение в группах исследуемых животных, или тестировать геропротекторы. К сожалению, построение кривых выживания требует трудовых, временных и финансовых затрат, в то время как методика с использованием биомаркёров намного проще. Проявление биомаркёров может хорошо коррелировать с хронологическим возрастом тестируемых организмов, но не со старением, то есть происходящим со временем увеличением вероятности смерти, однако многие исследователи игнорируют этот факт.

Стареющие организмы вымирают в соответствии с «законом Гомпертца». Существуют

и нестареющие организмы, вероятность смерти которых с возрастом не увеличивается, а иногда даже уменьшается [1]. Чтобы отличить первых от вторых, необходимо изучить форму кривых выживания когорт соответствующих организмов [2–5]. В очень редких случаях полного отсутствия смерти — например, в случае с пресноводной гидрой (*Hydra magnipapillata*, или *Hydra vulgaris*) при определенных условиях [1, 6] — кривая выживания представляет собой горизонтальную линию. Заключение о том, влияет тот или иной фактор на процесс старения, делается на основе изменения формы кривых выживания стареющих организмов под его воздействием. Можно предположить, что истинный геропротектор (любой агент, который замедляет процесс старения) должен вызывать смещение кривой выживания без изменения её формы вправо (то есть он должен увеличивать как среднюю, так и максимальную продолжительность жизни).

Кривые выживания строят не только для животных и людей, но и для клеточных популяций.

Например, вымирание клеточной популяции изучают в радиобиологии (вымирание под воздействием радиации) [7–9]. Также кривые выживания строят в экспериментах по изучению старения дрожжей и бактерий в модели хронологического/«стационарного» старения [10–14]. Ранее мы показали, что культура клеток млекопитающих в модели «стационарного старения» вымирает в соответствии с законом Гомпертца [15]. Целью настоящей работы стала попытка использования методов, применяемых для анализа кривых дожития экспериментальных животных, в экспериментах с непересеваемыми культурами клеток млекопитающих, вымирающих в ходе «стационарного старения».

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 пересеивали 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).

Для оценки влияния тех или иных соединений на кинетику роста клеток и их последующей гибели в стационарной фазе 3-суточные клетки засевали в герметично закрывающиеся стеклянные флаконы с плотностью 20–40 тыс. клеток/см². На следующие сутки подсчитывали количество прикрепившихся клеток и добавляли во флаконы среду, содержащую исследуемое

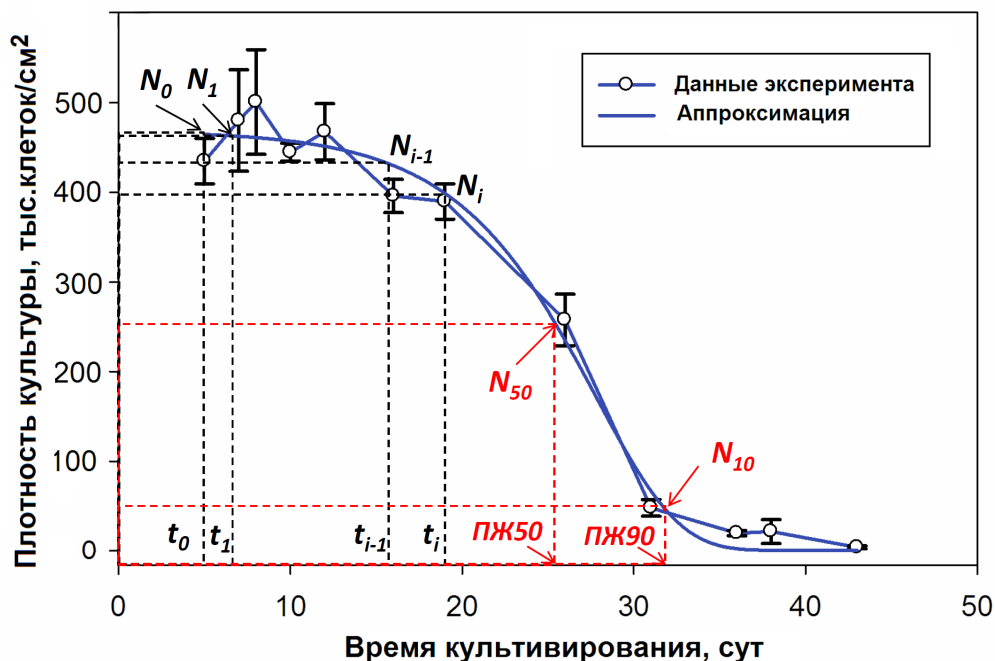


Рис. 1. Аппроксимация экспериментальных данных с помощью уравнения Гомпертца. N_0 – максимальная плотность культуры; t_0 – время начала фазы «плато»; t_1 – время, к которому культура достигла плотности N_1 ; N_{50} – плотность культуры к моменту времени, когда вымерло 50% популяции (ПЖ50 – медианная продолжительность жизни); N_{10} – плотность культуры к моменту времени, когда осталось лишь 10% популяции (ПЖ90 – время 90%-ной смертности). СПЖ рассчитывали по формуле (1).

соединение, а во флаконы контрольной группы – среду с соответствующим объемом растворителя. Через определённые промежутки времени снимали клетки с поверхности роста смесью растворов версена и трипсина, затем оценивали их количество с помощью камер Горяева (3–4 флакона на каждую точку, 4 камеры на каждый флакон).

На основании полученных данных строили кривые роста, пребывания в стационарной фазе и гибели клеток в контрольной и экспериментальной группах. Используя данные о кинетике вымирания культуры клеток, строили кривые выживания, а также рассчитывали среднюю продолжительность жизни (СПЖ) популяции клеток и определяли время, к которому погибнет 50 и 90% популяции в каждой группе – медианная продолжительность жизни (ПЖ50) и время 90%-ной смертности (ПЖ90) соответственно (рис. 1). В некоторых случаях использовали параметры уравнения Гомпертца, характеризующие вымирание, – такие как модальная продолжительность жизни (МПЖ; момент времени, когда скорость вымирания популяции максимальна – соответствует точке перегиба на кривой Гомпертца), а также сила смертности в нулевой момент времени (R_0) и темп старения (α) культуры. Для получения этих показателей принимали

стартовой точкой по оси времени те сутки, с которых начиналась фаза «плато» на кривой роста – t_0 (рис. 1). Для вычисления СПЖ использовали формулу:

$$\text{СПЖ} = \frac{1}{N_0} \sum_{i=1}^n \left[\left(t_{i-1} + \frac{t_i - t_{i-1}}{2} \right) \cdot (N_{i-1} - N_i) \right], \quad (1)$$

где N_0 – максимальная плотность культуры, t_i – время, к которому культура достигла плотности N_i .

Полученные кривые роста гибели клеток аппроксимировали с помощью уравнения Гомпертца. Сравнение выживаемости в контрольной и в опытной группах осуществляли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Математические расчёты и статистическую обработку данных производили с помощью программы SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., США). Все результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования мы получили некоторое количество кривых гибели непересеваемой культуры. В наших опытах клетки действительно вымирают в соответствии с уравнением Гомпертца, т.е. стареют (рис. 2). Это говорит о том, что вероятность их гибели со временем увеличивается экспоненциально, как и у стареющих животных или людей [15, 16].

Как было указано нами ранее, лучшим способом оценки влияния того или иного геропротектора на старение является построение кривых

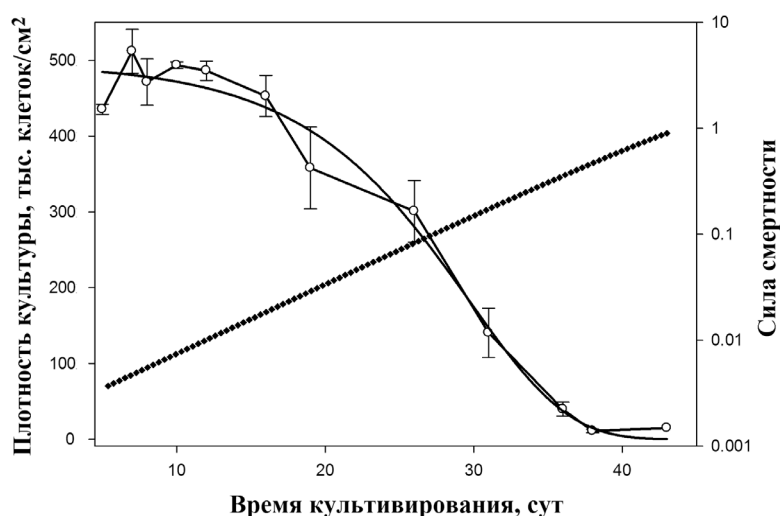


Рис. 2. Кривая гибели стационарной культуры клеток китайского хомячка. Ломаная линия – экспериментальные данные; сплошная линия – кривая, аппроксимированная в соответствии с уравнением Гомпертца ($R^2 = 0,983$); прерывистая линия – увеличение силы смертности со временем (логарифмическая шкала).

выживания/вымирания (survival/death curves) изучаемых модельных объектов. Построение и анализ кривых гибели непересеваемых культур клеток позволяют нам тестировать геропротекторы. Кроме того, мы получаем целый набор дополнительных параметров – среднюю и максимальную продолжительность жизни, скорость вымирания, силу смертности. Так как дисперсия на «хвосте» кривой увеличивается из-за увеличения гетерогенности популяции и уменьшения абсолютного количества клеток, мы заменили понятие максимальной продолжительности жизни на ПЖ90. В большинстве экспериментов мы оценивали полный цикл жизни культуры – рост, пребывание в стационарной фазе и вымирание [17–19]. Такой подход позволил нам условно разделить культуры по «возрасту». «Молодой» мы называем культуру, находящуюся в логарифмической фазе роста, «зрелой» – культуру, которая пребывает в стационарной фазе в течение 2–4 сут, «старой» – культуру в фазе вымирания.

Получать кривые для клеточных популяций проще, чем для некоторых модельных организмов, которые могут существовать длительное время, однако исследователь сталкивается с другой проблемой – не вполне понятно, с какого момента можно считать когорту сформировавшейся. Клетки в начале опыта стремительно делятся, затем их пролиферация замедляется и прекращается, что совпадает с началом фазы «плато». Мы приняли решение принимать за нулевое время (время «рождения» когорты) момент перехода культуры в «стационарную фазу» из фазы логарифмического роста (t_0). От этого момента мы производим аппроксимацию с помощью уравнения Гомпертца и рассчитываем все показатели.

Важно отметить, что для экспериментов с использованием модели «стационарного старения» и анализом кривых гибели клеточной культуры лучше не использовать нормальные (диплоидные) клетки, которые имеют «теломерный счётчик», так как это может вносить дополнительные искажения в получаемые кривые. В частности, рост однозначно будет различаться для двух культур, находящихся на разных пассажах, а от характера роста напрямую зависит вымирание культуры. В связи с этим, лучше использовать трансформированные или иммортализованные клетки, не имеющие пролиферативных ограничений [20].

Надо отметить, что в исследованиях с использованием модели хронологиче-

ского старения дрожжей также оценивают хронологическую продолжительность жизни культуры (среднее и максимальное время её выживания) [21, 22]. В таких исследованиях строятся кривые вымирания, однако нам не встречались работы, в которых была бы проведена аппроксимация полученных результатов. Более того, часто по форме кривых вымирания дрожжей видно, что их не получится аппроксимировать с помощью уравнения Гомпертца, так как на этих кривых нет так называемого «плеча». Такое «плечо» возникает в некоторых исследованиях, где изменяют условия культивирования, например, добавляют буфер [23] или изменяют состав питательных сред [11]. Это означает, что только при определённых условиях можно говорить о «старении» дрожжей [24], во многих случаях экспериментаторы изучают вымирание от других причин — истощение питательных веществ или отравление продуктами распада, но не старение.

В нашем эксперименте, проведённом ещё в 2015 г., при нашей обычной обработке данных мы не обнаружили геронотекторного эффекта у исследуемого препарата «Квинтон», или QMP (Quinton Marine Plasma) [17]. Мы оценивали различия только в отдельных точках и обнаружили, что в случае замены 44,4% среды Игла в модификации Дульбекко физиологическим раствором или QMP плотность культуры клеток китайского хомячка на 5-е сут в группе «физраствор» достоверно выше, чем в двух других (рис. 3А), также выше она на 31-е и 36-е сут в этой же группе, но по сравнению только лишь с контрольными показателями (рис. 3А). Такие результаты, на первый взгляд, свидетельствуют о том, что добавление физраствора улучшает пролиферативную активность клеток и их выживаемость в поздней стационарной фазе, а препарат QMP никак не действует на культуру. Однако более детальный анализ данных о вымирании с использованием нашего клеточно-кинетического подхода показал, что СПЖ культуры, выращенной на физрастворе, ниже на 17%, а культуры, выращенной на QMP, — выше на 7%, чем в контроле (СПЖ_{контроль} = 20,2 сут, СПЖ_{физраствор} = 16,8 сут, СПЖ_{QMP} = 21,56 сут; t_0 — 5 сут). Вымирание в группе «физраствор» происходило не в соответствии с уравнением Гомпертца (рис. 3Б), а по прямой, что свидетельствует о худшем состоянии культуры, чем в двух других группах. Можно полагать, что в этой группе

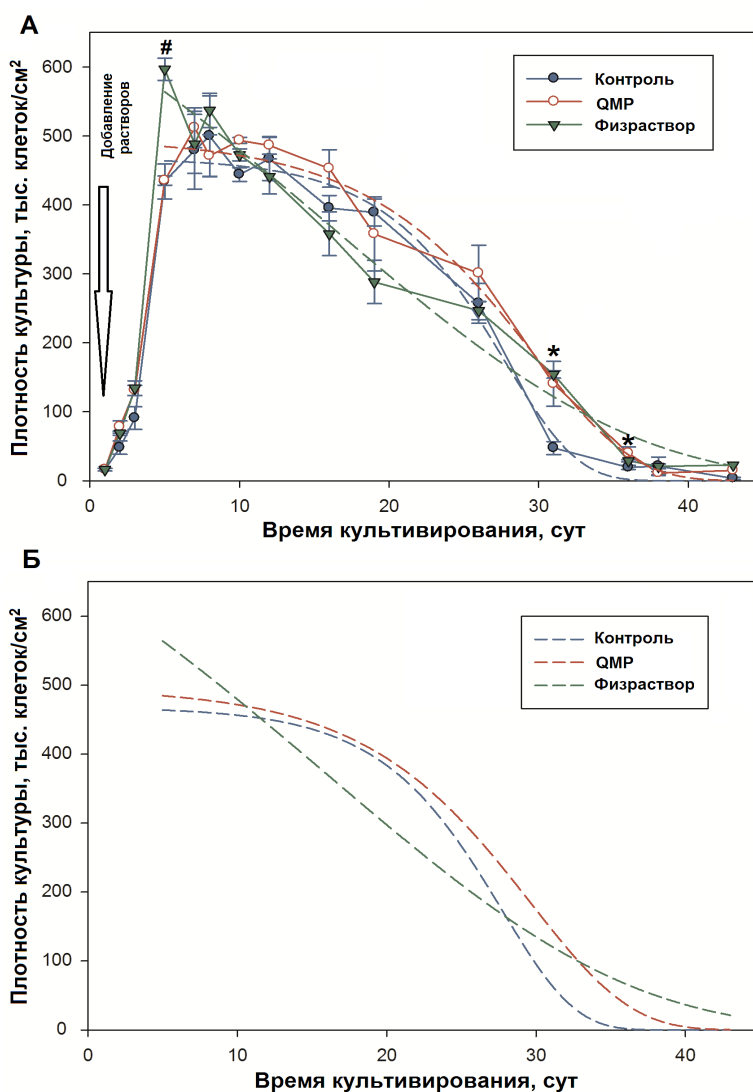


Рис. 3. Влияние разбавления на 44,4% среды Игла в модификации Дульбекко физиологическим раствором или препаратом «Квинтон» (QMP) на кинетику роста и «стационарное старение» культуры клеток китайского хомячка. А — экспериментальные данные с наложенной аппроксимацией (пунктирные линии); Б — только аппроксимация уравнением Гомпертца. Приведены средние $\pm$ стандартные ошибки среднего. * — достоверное отличие от контрольной группы, # — достоверное отличие и от контрольной группы, и от группы «QMP»; $p < 0,05$.

небольшая часть популяции клеток существует длительное время (даже больше, чем в двух других группах: ПЖ90_{физраствор} = 32 сут, ПЖ90_{контроль} = 27 сут, ПЖ90_{QMP} = 30 сут), но до середины эксперимента (приблизительно 20-е сут) доживает меньше клеток, чем в двух других группах (ПЖ50_{физраствор} = 16 сут; ПЖ50_{контроль} = 22 сут, ПЖ50_{QMP} = 23 сут). В группе «QMP» МПЖ, наряду с СПЖ и ПЖ90, оказывается выше, чем в контрольной группе (МПЖ_{контроль} = 22,8 сут, МПЖ_{QMP} = 23,7 сут, МПЖ_{физраствор} = 11 сут). Во всех трёх группах достоверно различаются распределения величин продолжительности жизни, при этом аппроксимированная кривая выжива-

ния в группе «QMP» лежит правее контрольной на протяжении всего периода гибели культуры (рис. 3Б), что позволяет предполагать наличие геропротекторных свойств у препарата QMP.

Таким образом, наш новый метод с использованием анализа кривых вымирания позволяет нам более точно анализировать характер «старения» культуры клеток. Благодаря этому мы можем тестировать потенциальные геропротекторные препараты, подбирать оптимальные для длительного культивирования условия и изучать старение самых разных клеточных линий и штаммов. Остаётся открытым вопрос о том, происходит ли вымирание в соответствии с законом Гомпертца и в стационарных клеточных популяциях организма, например, в популяции

нейронов. Так как известно, что вымирание компонентов системы не обязательно должно происходить по тем же законам, что и вымирание самих систем, клеточные популяции составляющие организм необязательно должны вымирать в соответствии с законом Гомпертца, но тем не менее можно предположить, что этот закон распространяется и на них.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, № АААА-А16-116021660098-8).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jones O.R., Scheuerlein A., Salguero-Gymes R., Camarda C.G., Schaible R., Casper B.B., Dahlgren J.P., Ehrlén J., García M.B., Menges E.S., Quintana-Ascencio P.F., Caswell H., Baudisch A., Vaupel J.W. Diversity of ageing across the tree of life // *Nature*. 2014. Vol. 505. N 7482. P. 169–173.
2. Comfort A. Ageing: The biology of senescence. London: Routledge & Kegan Paul, 1964. 365 pp.
3. Дубина Т.Л., Разумович А.Н. Введение в экспериментальную геронтологию. Минск: Наука и техника, 1975. 168 с.
4. Holliday R. Aging: The paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 pp.
5. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // *Curr. Aging Sci.* 2013. Vol. 6. N 1. P. 14–20.
6. Martínez D.E., Bridge D. Hydra, the everlasting embryo, confronts aging // *Int. J. Dev. Biol.* 2012. Vol. 56. N 6–8. P. 479–487.
7. Shuryak I., Sun Y., Balajee A.S. Advantages of binomial likelihood maximization for analyzing and modeling cell survival curves // *Radiat. Res.* 2016. Vol. 185. N 3. P. 246–256.
8. Kehwar T.S., Chopra K.L., Rai D.V. A unified dose response relationship to predict high dose fractionation response in the lung cancer stereotactic body radiation therapy // *J. Med. Phys.* 2017. Vol. 42. N 4. P. 222–233.
9. Herskind C., Liu Q., Liu X., Zhang Y., Ma L., Angelie E., Ma H.H., Liu J., Giordano F.A., Wenz F., Veldwijk M.R. A hypothesis of radioresistance and cell-survival curve shape based on cell-cycle progression and damage tolerance // *Radiat. Prot. Dosimetry*. 2018. Vol. 183. N 1–2. P. 107–110.
10. Fabrizio P., Longo V.D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* // *Aging Cell*. 2003. Vol. 2. N 2. P. 73–81.
11. Kawatek A., van der Klei I.J. At neutral pH the chronological lifespan of *Hansenula polymorpha* increases upon enhancing the carbon source concentrations // *Microb. Cell*. 2014. Vol. 1. N 6. P. 189–202.
12. Li X., Snyder M.P. Yeast longevity promoted by reversing aging-associated decline in heavy isotope content // *NPJ Aging Mech. Dis.* 2016. Vol. 2: 16004.
13. Belak Z.R., Harkness T., Eskiw C.H. A rapid, high-throughput method for determining chronological lifespan in budding yeast // *J. Biol. Methods*. 2018. Vol. 5. N 4: e106.
14. Yang Y., Santos A.L., Xu L., Lotton C., Taddei F., Lindner A.B. Temporal scaling of aging as an adaptive strategy of *Escherichia coli* // *Sci. Adv.* 2019. Vol. 5. N 5: eaaw2069.
15. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 1. P. 10–14.
16. 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.
17. Khokhlov A.N., Morgunova G.V., Ryndina T.S., Coll F. Pilot study of a potential geroprotector, «Quinton Marine Plasma», in experiments on cultured cells // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 1. P. 7–11.
18. 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.

19. *Morgunova G.V., Karmushakov A.F., Klebanov A.A., Khokhlov A.N.* Studies into the effect of «mild» uncoupling with 2,4-dinitrophenol on the growth of Chinese hamster cell culture and its subsequent dying out in the stationary phase // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 3. P. 163–169.

20. *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.

21. *Fabrizio P., Longo V.D.* Chronological aging-induced apoptosis in yeast // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2008. Vol. 1783. N 7. P. 1280–1285.

22. *Khokhlov A.N.* Which aging in yeast is «true»? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 11–13.

23. *Burtner C.R., Murakami C.J., Kennedy B.K., Kaerberlein M.* A molecular mechanism of chronological aging in yeast // *Cell Cycle.* 2009. Vol. 8. N 8. P. 1256–1270.

24. *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.

Поступила в редакцию 05.06.2019 г.

После доработки 16.08.2019 г.

Принята в печать 11.09.2019 г.

SHORT COMMUNICATION

DEMOGRAPHIC APPROACHES TO THE STUDY OF AGING ON CELL CULTURES

A.N. Khokhlov*, G.V. Morgunova, A.A. Klebanov

Evolutionary Cytoogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

**e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru*

Aging organisms die out in accordance with the «Gompertz law», i.e. the probability of their death increases with age. Survival curve construction is the main tool for gerontologists to study aging and test anti-aging drugs. The analysis of survival curves includes obtaining some indices characterizing aging of the population, for example, average and maximum life span, mortality rate, and aging rate. Testing of geroprotectors can be correctly performed only by obtaining such curves. The dying out of stationary cell populations – bacteria, yeast, and mammalian cell cultures – also occurs in accordance with the Gompertz equation. In this regard, it is reasonable to use the construction of survival curves and their analysis to study the «aging» of non-subcultured cell cultures and testing of anti-aging drugs on them. We used this approach in our own experiments, due to which we were able to detect the positive anti-aging effect of the Quinton Marine Plasma on stationary phase aging culture of Chinese hamster cells.

Keywords: *survival curves, Gompertz law, lifespan, cell aging, stationary phase aging, geroprotectors*

Сведения об авторах

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*

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

Указатель статей, опубликованных в журнале
«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология»
в 2019 году

№ Стр.

От редактора

Хохлов А. Н. Бессмертие зародышевой линии: бесконечная история **4** 241

Оригинальные исследования

Афони́на Е. Ю., Ташлыкова Н. А. Влияние факторов среды на структуру планктонных сообществ минеральных озер в разные фазы водности **1** 3

Баишников И. В., Узенбаева Л. Б., Илюха В. А., Кижина А. Г., Печорина Э. Ф., Ильина Т. Н. Сравнительно-видовое исследование влияния витаминов А и Е на лейкоцитарную формулу и морфометрические параметры лимфоцитов у хищных млекопитающих (Carnivora) **2** 64

Басс М. В., Армеев Г. А., Шайтан К. В., Шайтан К. Влияние онкомутаций и посттрансляционных модификаций гистона H1 на структуру и стабильность хроматосомы. **3** 154

Белевич Т. А., Ильяш Л. В., Чульцова А. Л., Флинт М. В. Пространственное распределение планктонных пикоцианобактерий на шельфе Карского моря, моря Лаптевых и Восточно-Сибирского моря **4** 247

Беляев О. А., Фарисенков С. Э. Исследование аллометрии формы и жилкования крыльев насекомых. Часть 2. Diptera **1** 10

Бондаренко С. А., Георгиева М. Л., Кокаева Л. Ю., Биланенко Е. Н. Первое обнаружение щелочеустойчивых грибов на побережье хлоридного озера Баскунчак **2** 73

Горемыкина Е. В., Рябышева А. А. Пространственное распределение склеренхимы в листовых пластинках некоторых овсяниц (*Festuca* L., Gramineae Juss.). **3** 163

Давидович Н. А., Давидович О. И., Подунай Ю. А., Полякова С. Л., Гастиньо Р. Очистка культур диатомовых водорослей, контаминированных кинетопластидой *Bodo saltans* Ehrenberg, 1832. **2** 80

Давидович О. И., Давидович Н. А., Гастиньо Р., Витковски А. Половое воспроизведение черноморской диатомовой водоросли *Climaconeis scalaris* (Brébisson) E.J. Сох **4** 254

Дмитриева Е. В. Экспериментальное исследование эмбрионального развития серой жабы (*Bufo bufo*): методические аспекты **3** 170

Дудова К. В., Джадоева Т. М., Дудов С. В., Ахметжанова А. А., Текеев Д. К., Онинченко В. Г. Конкурентная стратегия растений субальпийского высокоотравья Северо-Западного Кавказа. **3** 179

Иноземцев А. Н., Бережной Д. С., Новоселецкая А. В. Влияние диазепама, пирацетама и мексидола на условный рефлекс пассивного избегания **4** 270

- Калинина А.П., Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А. Антипаркинсоническая активность ингибитора пролилэндопептидазы в эксперименте у мышей. 2 87
- Капков В.И., Васильева С.Г., Лобакова Е.С. Развитие потенциально токсичной цианобактерии *Dolichospermum flos-aquae* (*Anabaena flos-aquae*) в водоемах бореальной зоны. 1 19
- Киселевский Д.Б., Самуилов В.Д. Проницаемость плазматической мембраны для йодида пропидия и разрушение ядер клеток в эпидермисе листьев гороха: действие полиэлектролитов и детергентов 3 188
- Коробов 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 3 195
- Коробова А.В., Ахиярова Г.Р., Федяев В.В., Фархутдинов Р.Г., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р. Участие сенсора нитратов NRT1.1 в регуляции уровня цитокининов и удлинения корней в норме и при дефиците азота 4 277
- Кублановская А.А., Ханчаева С.А., Зотов В.С., Зайцев П.А., Лобакова Е.С., Соловченко А.Е. Влияние суспензии клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (Chlorophyceae) на биологическую активность и микробиом почвы при возделывании фасоли 4 284
- Кузнецова В.М., Разумова О.В., Карлов Г.И., Данг Т.С., Крупин П.Ю., Дивашук М.Г. Некоторые особенности применения методов денатурационной и безденатурационной гибридизации *in situ* при изучении хромосом злаков 2 94
- Локтюшкин А.В., Ловягина Е.Р., Семин Б.К. Взаимодействие катионов тербия с донорной стороной фотосистемы 2 высших растений. 2 101
- Макаркина М.В., Ильницкая Е.Т., Токмаков С.В. ПЦР-идентификация патогенных агробактерий, выявленных на виноградниках Краснодарского края, по типу содержащихся в них Ti-плазмид 1 50
- 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 3 200
- Матвеева Д.К., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Выбор оптимального протокола получения децеллюляризованного внеклеточного матрикса мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека 4 294
- Моисеенко А.В., Лойко Н.Г., Чертков О.В., Феофанов А.В., Крупянский Ю.Ф., Соколова О.С. Анализ элементного состава ДНК-белковых кристаллов *in vitro* 4 301
- 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 3 207
- Низовцева Е.В., Герасимова Н.С., Студитский В.М. Влияние ацетилирования гистона H4 на дистанционные взаимодействия в хроматине. 4 308
- Новоселецкий В.Н., Армеев Г.А., Шайтан К.В. Составление и анализ матриц аминокислотных замен для оптимального выравнивания последовательностей микробных родопсинов 1 27

- Перепелкина О.В., Огиенко Н.А., Лилья И.Г., Гарбуз Д.Г., Ревущин А.В., Павлова Г.В., Полетаева И.И. Влияние однократного прогревания на поведение, нейрогенез взрослого мозга и экспрессию белка теплового шока HSP-70 у лабораторных мышей. 2 107
- Потехина В.М., Аверина О.А., Кузьмин В.С. Суправентрикулярный миокард сердца мышей В6СВАF1 проявляет генетически обусловленную аритмогенность благодаря эктопической автоматии и триггерной активности 2 115
- Потехина В.М., Кузьмин В.С., Абрамочкин Д.В. Внеклеточный диаденозинтетрафосфат подавляет эктопическую активность в миокардиальной ткани легочных вен у взрослых, но не у новорожденных крыс 1 34
- Пустовит К.Б., Малолина Е.А. Эффекты активации $\alpha 1$ -адренорецепторов в межпредсердной перегородке у новорожденных и взрослых крыс 3 215
- Рязанова Г.И. Стрекозы и антропогенное засоление внутренних вод 1 42
- Солдатенко А.С., Карачевцева М.А., Шереметьев В.А., Кудряшова А.А., Архипова А.Ю., Андреев В.А., Прокошкин С.Д., Браиловский В., Мойсенович М.М., Шайтан К.В. Особенности взаимодействия *in vitro* остеобластоподобных клеток MG-63 с поверхностью сплавов системы Ti-Zr-Nb, обладающих памятью формы 4 313
- Столяров А.П. Особенности видовой, пространственной и трофической структуры макробентоса в лагунных экосистемах Ермолинской и Никольской губ (Кандалакшский залив, Белое море) 3 222
- Чан К.Х. Первые данные о раковинных амёбах реки Коко провинций Куангнам и Дананг, Вьетнам 4 262
- Юзбеков А.К., Цзусюнь У. Углекислотный газообмен древесных растений в урбанизированных экосистемах 4 321
- Яковенко И.А., Шумов Д.Е., Петренко Н.Е., Козлов М.К., Дорохов В.Б. Изучение взаимодействия ритмических компонентов ЭЭГ на первой стадии дневного сна 2 123
- Яковлев Л.В., Сыров Н.В., Морозова Е.Ю., Каплан А.Я. Кортикоспинальная возбудимость человека при представлении движений в сопряжении с функциональной электростимуляцией 3 229
- Яскин В.А. Сезонная изменчивость архитектоники гиппокампа рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*, Rodentia) 2 129

Обзоры

- Лебедев В.В., Буцан С.Б. Использование раствора Карнуа и его модификаций для уменьшения количества рецидивов после хирургического удаления кератокистозных одонтогенных опухолей и амелобластом: систематический обзор 2 135

Краткие сообщения

- Орехова А.В., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Возможность применения внеклеточной протеазы микромицета *Aspergillus ochraceus* для определения содержания фактора X в плазме крови человека 2 146
- Хохлов А.Н., Моргунова Г.В., Клебанов А.А. Демографические подходы к изучению старения на клеточных культурах. 4 328