

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16 **БИОЛОГИЯ**

Издательство Московского университета

№ 4 • 2014 • ОКТЯБРЬ–ДЕКАБРЬ

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Физиология

- Сангаджиева А.Д., Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Мезенцева М.В., Андреева Л.А., Мясо-
едов Н.Ф. Влияние глипролинов PGR и N-acetyl-PGR на экспрессию генов цито-
кинов при стрессорном и ацетатном язвобразовании 3
- Кузенков В.С., Крушинский А.Л. Протекторное влияние нитрата магния на ишемию
мозга 9

Геронтология

- Хохлов А.Н. О бессмертной гидре. Опять 15
- Лапицина Н.Е., Негашева М.А., Окушко Р.В. Влияние некоторых биосоциальных фак-
торов на темпы старения и продолжительность жизни женщин (на примере изуче-
ния долгожителей г. Тирасполь). 20

Биофизика

- Казакова Т.А., Новиков С.М., Левин Г.Г., Максимов Г.В. Исследование состояния цито-
плазмы нейрона методом динамической фазовой микроскопии 25

Экология

- Юзбеков А.К., Замолотчиков Д.Г., Иващенко А.И. Фотосинтез у ели европейской в лес-
ных экосистемах экспериментального полигона “Лог Тажный”. 32
- Лобакова Е.С., Васильева С.Г., Дольникова Г.А., Кашеева П.Б., Дедов А.Г. Изучение
иммобилизации ассоциации бактерий-нефтедеструкторов на полимерных матери-
алах различной химической природы 36

Энтомология

- Бенедиктов А.А. Виброакустические сигналы кузнечиков подсемейства Conocerphalinae
(Orthoptera, Tettigoniidae) европейской части России 43

Фауна, флора

- Гаврилов В.В., Моргунова Г.В. Суточные ритмы энергетического метаболизма покоя
и дыхательного коэффициента у московок (*Periparus ater*, Aves) в осенне-зимний
период 46
- Указатель статей, опубликованных в журнале “Вестник Московского университета.
Серия 16. Биология” в 2014 году 51

CONTENTS

Physiology

- Sangadzhieva A.D., Bakaeva Z.V., Samonina G.E., Mezentseva M.V., Andreeva L.A., Myasodov N.F.* Impact of glyprolines on cytokines gene expression in stress- and acetate-induced erosion of stomach 3
- Kouzenkov V.S., Krushinsky A.L.* Sodium potassium effect on development of neurological deficiency in experimental model of brain ischemia 9

Gerontology

- Khokhlov A.N.* On the immortal hydra. Again 15
- Lapshina N.E., Negasheva M.A., Okushko R.V.* Influence of several biological and social factors on the rate of aging and women lifespan on the example of the case study of Tiraspol long-livers 20

Biophysics

- Kazakova T.A., Novikov S.M., Levin G.G., Maksimov G.V.* Using the dynamic phase microscopy for neuron cytoplasm studies 25

Ecology

- Yuzbekov A.K., Zamolodchikov D.G., Ivaschenko A.I.* Spruce fir photosynthesis in the forest ecosystems of the test area "Log Tayezhnyi" 32
- Lobakova E.S., Vasilieva S.G., Dolnikova G.A., Kascheeva P.B., Dedov A.G.* Investigation of immobilization of bacteria association on different polymeric materials 36

Entomology

- Benediktov A.A.* Vibro-acoustical signals of the meadow katydids from the subfamily Conocephalinae (Orthoptera, Tettigoniidae) from European part of Russia 43

Fauna, Flora

- Gavrilov V.V., Morgunova G.V.* Diurnal rhythms of standard metabolic rate and respiratory quotient in coal tit (*Parus ater*) in autumn-winter period 46
- Index of papers published in "Vestnik Moskovskogo Universiteta. Biologia" in 2014* 51

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 577.112.6:616.33-002.44:612.017.1

**ВЛИЯНИЕ ГЛИПРОЛИНОВ PGP и N-acetyl-PGP
НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ
ПРИ СТРЕССОРНОМ И АЦЕТАТНОМ ЯЗВООБРАЗОВАНИИ****А.Д. Сангаджиева, З.В. Бакаева¹, Г.Е. Самонина,
М.В. Мезенцева², Л.А. Андреева³, Н.Ф. Мясоедов³***(кафедра физиологии человека и животных; e-mail: bakaeва_z@mail.ru)*

Исследовано влияние глипролинов PGP и N-acetyl-PGP на экспрессию генов цитокинов при стрессорном и ацетатном язвообразовании. Определение активности мРНК в мононуклеарах периферической крови проводили с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Интраназальное введение пептида PGP (3,7 мкмоль/кг) оказывает выраженное протекторное действие при стрессорном (59,4%) и ацетатном язвообразовании (78,5%) у крыс. N-acetyl-PGP не уменьшает площадь стрессорных повреждений, но имеет тенденцию предупреждать развитие ацетатных язв. Показано, что у контрольных животных образование стрессорных повреждений слизистой оболочки желудка в ряде случаев сопровождается повышением транскрипции ФНО α и угнетением транскрипции ИЛ-4. Развитие ацетатных язв сопровождается снижением экспрессии генов ряда цитокинов: ИФН α , ИФН γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-12 и ФНО α . Протекторный противоязвенный эффект PGP сопровождается повышенной транскрипцией ИЛ-6. На фоне N-acetyl-PGP происходит нарастание экспрессии генов цитокинов Th-1 и 2 типа: ИФН α , ИФН γ и ИЛ-4.

Ключевые слова: язва желудка, стресс, глипролины, цитокины.

В основе нарушения целостности слизистой оболочки желудка (СОЖ) лежат различные механизмы ulcerогенеза, которые в разной степени проявляются при различных моделях язвообразования.

При стрессе главную роль играют центральные механизмы. Стресс вызывает гиперактивацию симпатической нервной системы, что сопровождается временным уменьшением как агрессивных, так и защитных факторов гомеостаза СОЖ. Возникающие при этом повреждения имеют вид точечных кровоизлияний, которые в литературе рассматриваются как стрессорные язвы. Нарушение гомеостаза СОЖ при стрессе связано с уменьшением кровотока, повышением кислой секреции, повышением проницаемости сосудов желудка и снижением числа тучных клеток [1–3].

В отличие от стрессорных и этаноловых язв, которые относительно быстро развиваются и регенерируют, ацетатная язва по методу Окабе [4] по своим гистоморфологическим и временным характеристикам аналогична хроническим язвам у человека. Хорошо выраженный кратер, иногда с прободением в брюшную полость, формируется к четвертому дню после ulcerогенеза. Такие глубокие повреждения связаны прежде всего с нарушением локального кровото-

ка в области аппликации кислоты, уменьшением числа тучных клеток в СОЖ в течение 24 ч. В процессе заживления значительно увеличивается число тучных клеток, превышая контрольный уровень в 2–7,7 раза. Тучные клетки оказывают большую роль в развитии и заживлении укусно-кислых язв [5].

Важную роль в развитии воспалительных процессов играют цитокины, обеспечивающие передачу сигнала между разными видами клеток как в физиологических условиях, так и при действии различных патогенных факторов [6]. Цитокины синтезируются иммунокомпетентными клетками организма. В норме цитокины продуцируются в минимальных количествах, достаточных для проявления биологического эффекта; при различных патологиях их содержание многократно возрастает [7].

Было показано, что глипролины (PGP, PG, GP и др.), являющиеся фрагментами коллагена и эластина, повышают устойчивость слизистой оболочки желудка к действию различных ulcerогенных факторов. Противоязвенные эффекты глипролинов были показаны на разных моделях язвообразования при их внутрибрюшинном и внутрижелудочном введениях [8]. В данном исследовании мы изучили влияние пептидов PGP и N-acetyl-PGP при интраназальном введе-

¹ ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

² ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Иванковского Минздрава России.

³ Институт молекулярной генетики РАН.

нии на устойчивость СОЖ к действию водоиммерсионного стресса и ледяной уксусной кислоты. Протекторные противоязвенные свойства сопоставили с экспрессией генов цитокинов в СОЖ.

Задачей нашего исследования было изучение изменения синтеза цитокинов на уровне транскрипции, а не на уровне продукции, который обычно изучается большинством авторов. Нарушение синтеза цитокинов на уровне экспрессии их генов исследовано недостаточно и представляет научный и практический интерес, так как разные лекарственные средства действуют на разных этапах синтеза цитокинов.

Материалы и методы

За сутки до проведения эксперимента животных подвергали 18-часовой пищевой и питьевой депривации. Стрессорные язвы желудка вызывали у крыс линии Вистар плаванием в воде (21–22 °С) в течение 30 мин.

Ацетатную язву у белых беспородных крыс вызывали кратковременной аппликацией ледяной уксусной кислоты на серозную оболочку желудка по методу Окабе [4] с небольшими модификациями [9].

Животные были разделены на 3 группы: контрольная и две опытные. Исследуемые пептиды PGP и N-acetyl-PGP, синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН, вводили интраназально в дозе 3,7 мкмоль/кг в объеме 10 мкл/200 г веса животного за час до стресса или один раз в день в течение 3 дней после аппликации. Во всех экспериментах животные контрольной группы получали со-

ответствующие объемы физиологического раствора. Непосредственно перед опытом пептиды растворяли в физиологическом растворе. Эвтаназию осуществляли через час после окончания действия стрессорного фактора и на 4-й день после аппликации ледяной уксусной кислоты. Площадь язвенных повреждений СОЖ измеряли под окуляр-микрометром в мм². Противоязвенный эффект оценивали по отношению средней площади повреждений у опытных животных к площади повреждений у контрольных и выражали в процентах.

Оценку цитокинового профиля определяли по наличию мРНК 9 цитокинов (интерферон (ИФН) α , ИФН γ , интерлейкин (ИЛ)-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12 и фактор некроза опухоли (ФНО) α в мононуклеарных клетках периферической крови. Кровь брали из яремной вены. Экспрессию генов цитокинов определяли скрининговым методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с качественной детекцией (ОТ-ПЦР). В качестве положительного контроля использовали β -актин. Регистрацию результатов ПЦР осуществляли электрофоретически в 2,5%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы "Promega" (G 1758). Специфические праймеры выбирали при помощи общедоступной базы RTPrimerDB (таблица). Выделение РНК проводили по методике P. Chomczynsky, N. Sacchi [10] методом кислой гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформ экстракции. ОТ-ПЦР были выполнены в соответствии с методикой, предложенной Gelder [11].

По степени свечения ПЦР продуктов оценивали наличие, отсутствие и низкую экспрессию мРНК.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрических критериев Манна–Уитни и Вилкоксона. Эксперименты проводили в соответствии с нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и декларацией о гуманном отношении к животным.

Результаты исследований

Стресс вызывал повреждения СОЖ, площадь которых составила в среднем $1,01 \pm 0,16$ мм², $n = 13$ (рис. 1). PGP уменьшал площадь повреждений до $0,41 \pm 0,08$ мм², $n = 12$. В группе n-acetyl-PGP площадь стрессорных язв составила в среднем $1,04 \pm 0,19$ мм², $n = 13$ (рис. 1, А). Площадь ацетатных язв в контроле была равна в среднем $43,64 \pm 17,01$ мм², $n = 9$ мм². PGP уменьшал тяжесть повреждений СОЖ до $9,39 \pm 3,43$ мм², $n = 9$ мм². N-acetyl-PGP проявил только тенденцию к уменьшению размера язв до $22,38 \pm 9,20$ мм², $n = 8$ мм² (рис. 1, Б).

Исследование цитокинового профиля у животных через 1 ч после стресса показало, что пла-

Олигонуклеотидные последовательности праймеров базы RTPrimerDB

Праймеры	Последовательность нуклеотидов
β -актин	5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3' CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC
ИФН α (интерферон α)	5' TCC ATG AGA GAT TCC AGC AG 3' ATT TCT CGC TCT GAC AAC CTC CC
ИФН γ (интерферон γ)	5' AGT TAT ATC TTG GTC TTT CA 3' ACC GAA TAA TTA GTC AGC TT
ИЛ-2	5' ACT CAC CAG GAT GCT CAC AT 3' AGG TAA TCC ATC TGT TCA GA
ИЛ-4	5' CTT CCC CCT CTG TTC TTC CT 3' TTC CTG TCG AGC CGT TTC AG
ИЛ-6	5' ATG TAG CCG CCC CAC ACA GA 3' CAT CCA TCT TTT TCA GCC AT
ИЛ-8	5' TTG GCA GCC TTC CTG ATT TCT 3' TTT CCT TGG GGT CCA GAC AGA
ИЛ-10	5' ATG CCC CAA GCT GAG AAC CAA GAC CCA 3' TCT CAA GGG GCT GGG TCA GCT ATC CCA
ИЛ-12	5' CCT CAG TTT GGC CAG AAA CC 3' GGT CTT TCT GGA GGC CAG GC
ФНО α	5' TCT CGA ACC CCG AGT GAC AA 3' TAT CTC TCA GCT CCA CAC CA

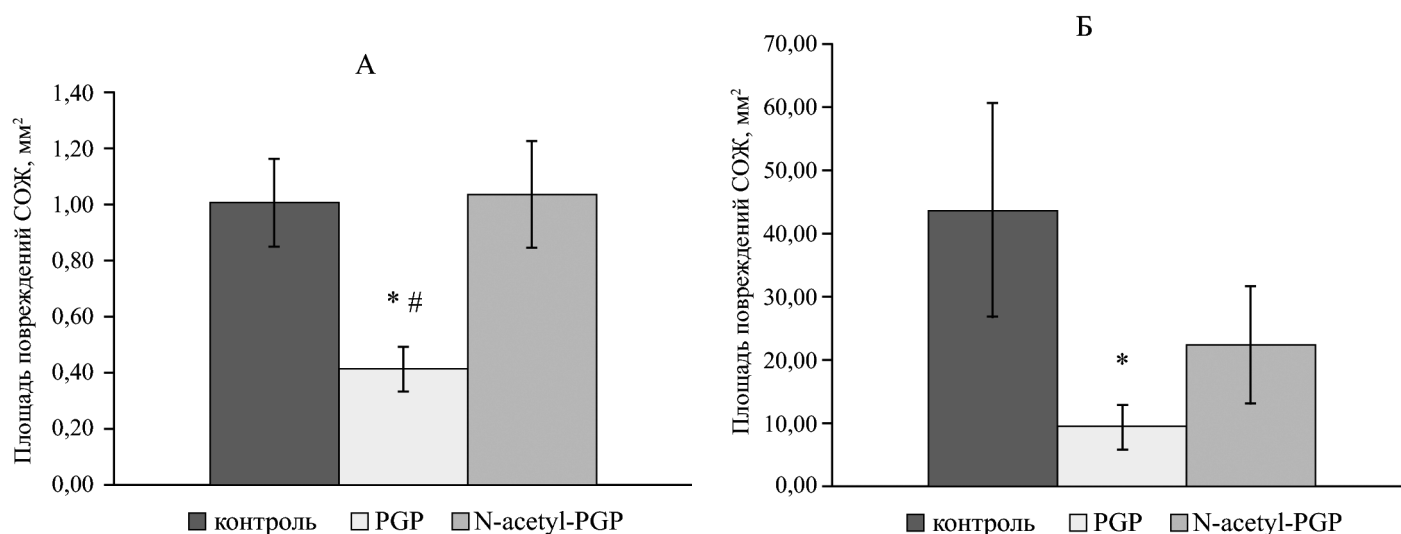


Рис. 1. А — площадь повреждения СОЖ после стресса у крыс линии Вистар (* $p < 0,05$ к контролю, # $p < 0,05$ к N-acetylPGP), Б — площадь повреждения СОЖ после аппликации ледяной уксусной кислоты у белых беспородных крыс (* $p < 0,05$ к контролю)

вание не вызывало достоверно значимых изменений экспрессии генов цитокинов в контрольной группе. Однако в ряде случаев это сопровождалось увеличением числа животных, у которых была выявлена активация экспрессии ФНО α и угнетение транскрипции следующих цитокинов: ИФН α , ИЛ-4 (рис. 2, А).

Через 1 ч после стресса на фоне действия PGP происходило угнетение экспрессии ИФН α , ИЛ-4 и активация транскрипции гена ИЛ-6, ФНО α (рис. 2, Б).

Было отмечено (рис. 2, В), что у крыс, получивших N-acetyl-PGP, увеличивалось число животных с экспрессией генов ИФН α , ИФН γ , ИЛ-4, -6, -8 и ФНО α .

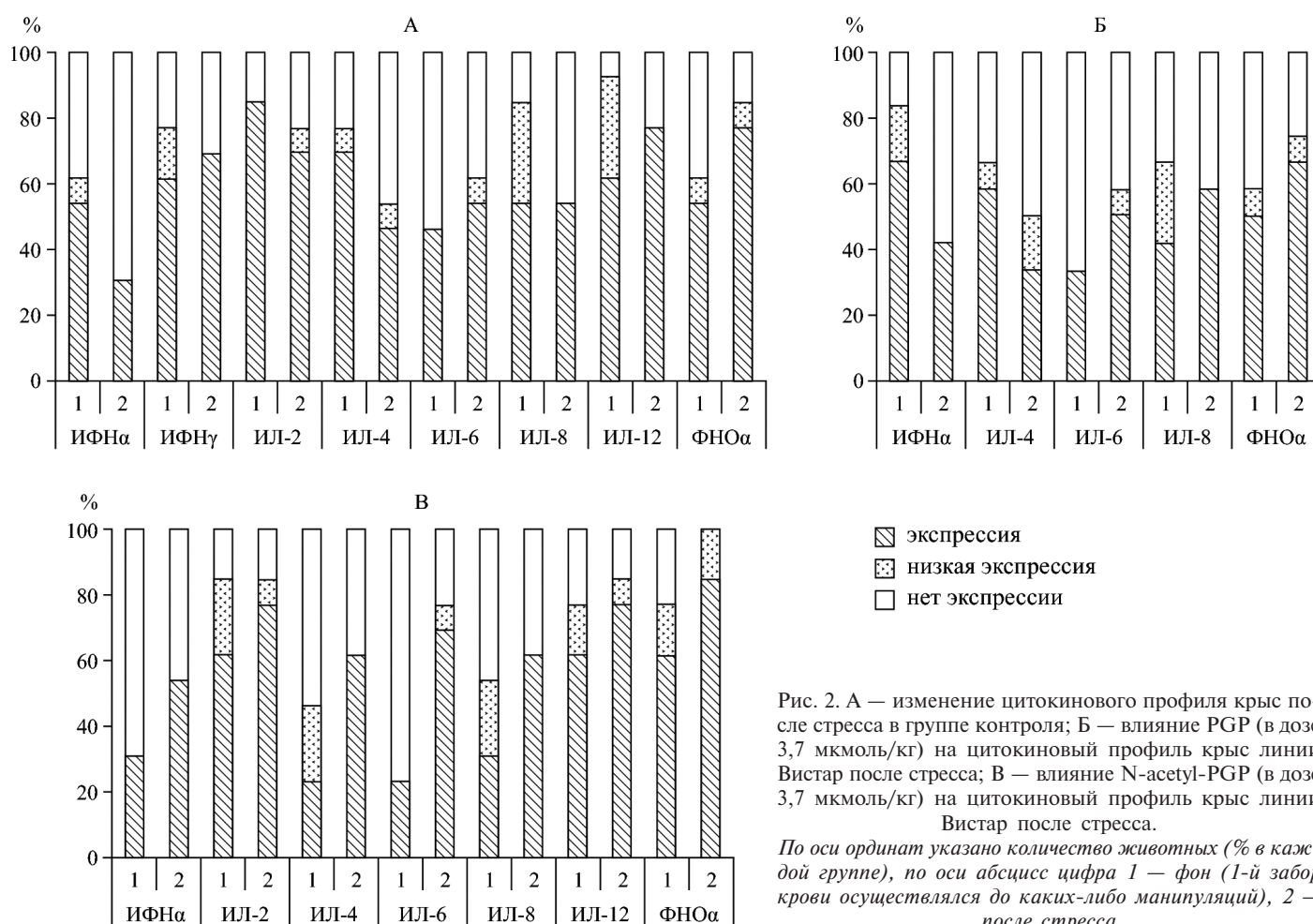


Рис. 2. А — изменение цитокинового профиля крыс после стресса в группе контроля; Б — влияние PGP (в дозе 3,7 мкмоль/кг) на цитокиновый профиль крыс линии Вистар после стресса; В — влияние N-acetyl-PGP (в дозе 3,7 мкмоль/кг) на цитокиновый профиль крыс линии Вистар после стресса.

По оси ординат указано количество животных (% в каждой группе), по оси абсцисс цифра 1 — фон (1-й забор крови осуществлялся до каких-либо манипуляций), 2 — после стресса

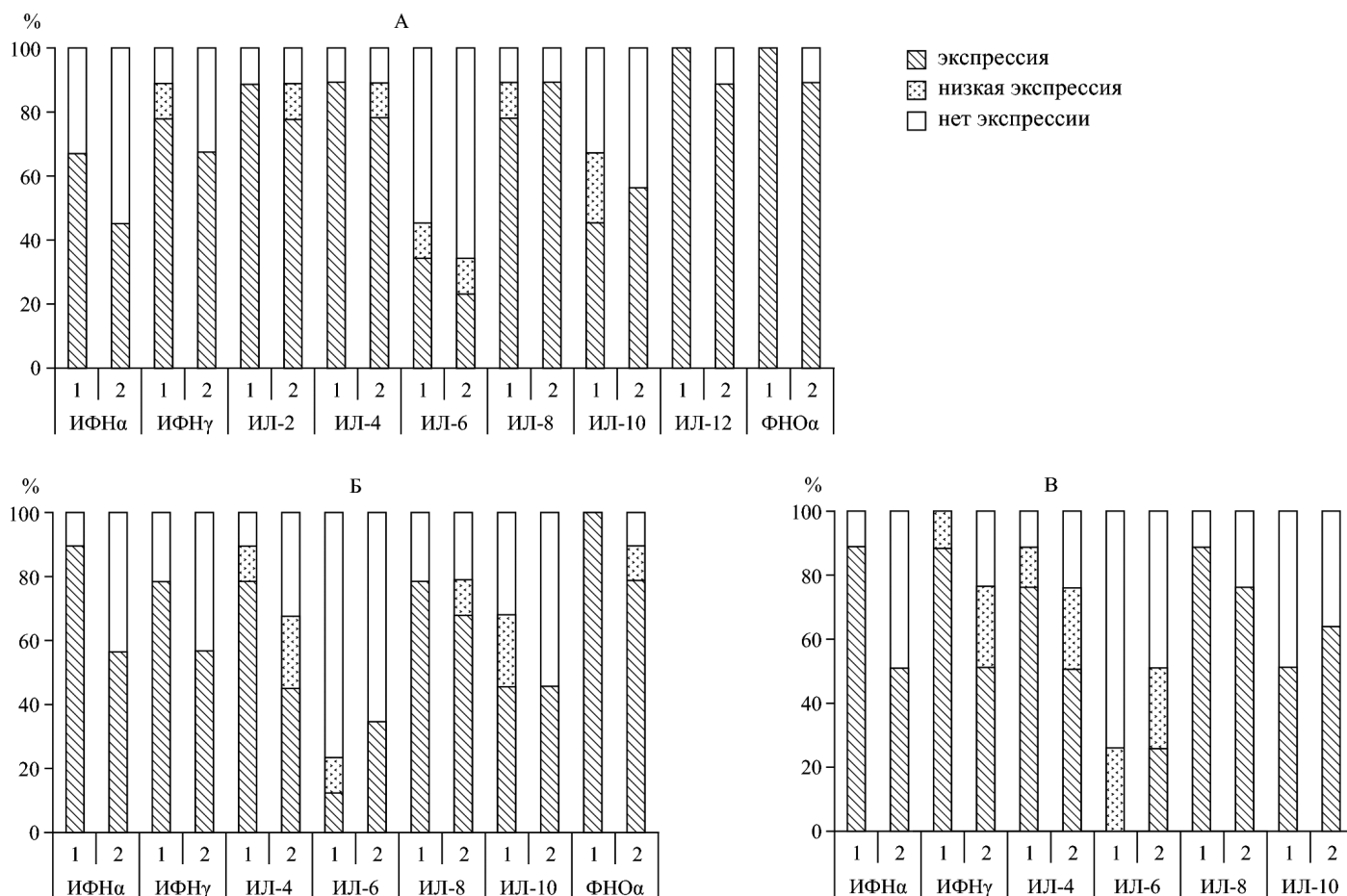


Рис. 3. А — изменение цитокинового профиля беспородных крыс после ацетатного язвобразования в группе контроля; Б — изменение цитокинового профиля беспородных крыс после ацетатного язвобразования в группе PGR (в дозе 3,7 мкмоль/кг); В — изменение цитокинового профиля беспородных крыс после ацетатного язвобразования в группе N-acetyl-PGR (в дозе 3,7 мкмоль/кг).

По оси ординат указано количество животных, принятое за 100% для каждой группы; по оси абсцисс цифра 1 — фон (забор крови до каких-либо введений), 2 — на 4-й день после аппликации уксусной кислоты

Ацетатное язвобразование на 4-й день в группе контроля сопровождалось изменением числа животных, у которых наблюдалось угнетение транскрипции практически всех цитокинов, за исключением ИЛ-8. У 90% животных наблюдалась экспрессия гена ИЛ-8 (рис. 3, А).

Цитокиновый профиль на фоне PGR и N-acetyl-PGR практически не отличался от контроля. Однако в опытных группах было больше животных с экспрессией гена ИЛ-6 и, наоборот, меньше с ИЛ-8 (рис. 3, Б, В).

Обсуждение результатов

Таким образом, было выявлено, что интраназальное введение пептида PGR (в дозе 3,7 мкмоль/кг) оказывает протекторное действие при стрессорном на 59,4% и ацетатном язвобразовании на 78,5% у крыс.

Водоиммерсионный стресс у контрольных животных снижает экспрессию гена ИФН̑, который имеет регуляторную противовирусную значимость, а также уровень противовоспалительного ИЛ-4. При воздействии стрессогенного фактора повышается транскрип-

ция ФНО̑, что согласуется с литературными данными [12, 13].

Можно предположить, что введение пептида PGR приводит к выраженной активации моноцитарно-макрофагального звена иммунитета (повышение экспрессии ИЛ-6), а введение пептида N-acetyl-PGR также и Т-хелперов (Тх) 1 и 2 типа (увеличение экспрессии генов ИФН̑, ИФН̒, ИЛ-4). Данное предположение требует дальнейшего экспериментального подтверждения с определением продукции цитокинов. Постстрессорные изменения уровня транскрипции ФНО̑ несколько отличаются у крыс, получавших разные пептиды. На фоне противоязвенного эффекта PGR экспрессия гена ФНО̑ увеличивалась незначительно по сравнению с контролем и группой N-acetyl-PGR.

Аппликация ледяной уксусной кислоты на серозную оболочку желудка вызывает значительное снижение экспрессии ИФН̑, ИФН̒, ИЛ-2, 4, 6, 12 и ФНО̑. Изменение функционирования системы интерферона, который осуществляет в организме полифункциональное действие, в том числе подавляет пролиферацию клеток, может быть оправданной мерой в случае нарушения целостности ткани, однако длительная им-

муносупрессия может стать причиной усугубления тяжести и хронизации язвенного заболевания.

Интересно, что неизменным остается влияние глипролинов на экспрессию гена ИЛ-6. Они однозначно увеличивают его транскрипцию при стрессорном и ацетатном язвообразовании, что, конечно, не может являться гарантией увеличения его продукции и требует дальнейшего экспериментального подтверждения. Исследования последних лет показали, что содержание ИЛ-6 в крови повышается при заболеваниях с выраженным воспалительным компонентом. Данный факт позволяет рассматривать этот цитокин в качестве маркера агрессивности течения заболевания [14]. Однако он оказывает разнообразное и очень существенное влияние на многие органы и системы организма: кровь, печень, обмен веществ, иммунную и эндокринную системы. В частности, ИЛ-6 подавляет секрецию ФНО α и ИЛ-1 β [15], активирует продукцию печенью белков острой фазы воспаления [16] и стимулирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему [17], что способствует регуляции воспалительного процесса. В этом смысле ИЛ-6 можно рассматривать и как провоспалительный, и как противовоспалительный цитокин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Glavin G.B., Szabo S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies // *FASEB J.* 1992. Vol. 6. N 3. P. 825–831.
2. Mayer E.A. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease // *Gut.* 2000. Vol. 47. N 6. P. 861–869.
3. Филаретова Л.П. Стресс и язвообразование в желудке: гастропротективная роль глюкокортикоидных гормонов // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2009. Т. 95. № 10. С. 1160–1170.
4. Okabe S., Roth J.L.A., Pfeiffer C.J. A method for experimental, penetration gastric and duodenal ulcer in rat. Observation on normal healing // *Amer. J. of Digestive disease.* 1971. Vol. 16. N 3. P. 277–284.
5. Nakajima S., Arizono N., Hattori T., Bamba T. Increase in mucosal and connective tissue-type mast cells in the stomach with acetic acid-induced ulcer in rat // *APMIS.* 1996. Vol. 104. N 1. P. 19–29.
6. Arakawa T., Watanabe T., Tanigawa T., Tominaga K., Fujiwara Y., Morimoto K. Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: its pathophysiology and clinical relevance // *World J. Gastroenterol.* 2012. Vol. 18. N 35. P. 4811–4822.
7. Stanley A.C., Lacy P. Pathways for cytokine secretion // *Physiology (Bethesda).* 2010. Vol. 25. N 4. P. 218–229.
8. Самонина Г.Е., Копылова Г.Н., Умарова Б.А., Бакаева З.В., Мезенцева М.В. Некоторые механизмы противовоспалительных эффектов глипролинов // *Вопр. биол., мед. и фарм. химии.* 2011. № 4. С. 58–64.
9. Бакаева З.В., Самонина Г.Е. Глипролины уменьшают развитие и ускоряют заживление ацетатных язв у крыс // *Патофизиол. и эксперимент. терапия.* 2005. № 2. С. 25–26.

Выводы

1. Интраназальное введение пептида PGP (3,7 мкмоль/кг) оказывает выраженное протекторное действие при стрессорном (59,4%) и ацетатном язвообразовании (78,5%) у крыс.
2. Ведущая роль в развитии стрессорных язв может принадлежать ФНО α . Снижение транскрипции ИЛ-4 может уменьшать противовоспалительный потенциал СОЖ при стрессе.
3. Развитие ацетатных язв сопровождается снижением числа животных с экспрессией генов ряда цитокинов: ИФН α , ИФН γ , ИЛ-2, 4, 6, 12 и ФНО α . Одновременное снижение нескольких компонентов иммунного ответа и тесно взаимодействующих с ними неспецифических факторов может влиять на выраженность воспалительного процесса и скорость репаративных функций СОЖ.
4. Протекторный противоязвенный эффект PGP наблюдается у животных с транскрипцией ИЛ-6.
5. На фоне N-acetyl-PGP происходит нарастание экспрессии генов цитокинов Tx-1 и 2 типа ИФН α , ИФН γ и ИЛ-4, однако может не гарантировать изменение их продукции.

10. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 162. N 1. P. 156–159.
11. Gelder C.M., Thomas P.S., Yates D.H., Adcock I.M., Morrison J.F., Barnes P.J. Cytokine expression in normal, atopic, and asthmatic subject using the combination of sputum induction and the polymerase chain reaction // *Thorax.* 1995. Vol. 50. N 10. P. 1033–1037.
12. Ksontini R., MacKay S.L., Moldawer L.L. Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation // *Arch. Surg.* 1998. Vol. 133. N 5. P. 558–567.
13. Zelová H., Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances // *Inflamm. Res.* 2013. Vol. 62. N 7. P. 641–651.
14. Papanicolaou D.A., Wilder R.L., Manolagas S.C., Chrousos G.P. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease // *Ann. Intern. Med.* 1998. Vol. 128. N 2. P. 127–137.
15. Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark S.C., Dinarello C.A. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF // *Blood.* 1990. Vol. 75. P. 40–47.
16. Heinrich P.C., Castell J.V., Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response // *Biochem J.* 1990. Vol. 265. P. 621–636.
17. Lyson K., McCann S.M. The effect of interleukin-6 on pituitary hormone release in vivo and in vitro // *Neuroendocrinology.* 1991. Vol. 54. P. 262–266.

IMPACT OF GLYPROLINES ON CYTOKINES GENE EXPRESSION IN STRESS- AND ACETATE-INDUCED EROSION OF STOMACH

*A.D. Sangadzhieva, Z.V. Bakaeva, G.E. Samonina,
M.V. Mezentseva, L.A. Andreeva, N.F. Myasoedov*

The influence glyprolines PGP and N-acetyl-PGP on gene expression of cytokines in stress-induced and acetate-induced ulceration in rats was investigated. Determination of the activity of mRNA in peripheral blood mononuclear cells was performed using methods of reverse transcription and polymerase chain reaction. Intranasal peptide PGP (3,7 $\mu\text{mol/kg}$) and has a strong protective effect in stress model (59,4%) and acetate model (78,5%) in rats. N-acetyl-PGP does not reduce the area of stress damage in gastric mucosa and has tendency to prevent the development of acetate ulcers. It is shown that in the control animals the formation of stress damage in the gastric mucosa in some cases accompanied by increased transcription of $\text{TNF}\alpha$ and inhibition of transcription of IL-4. Development acetate ulcers accompanied by a decrease of gene expression of few cytokines: $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 and $\text{TNF}\alpha$. Protective antiulcer effect PGP followed by increased transcription of IL-6. In group of N-acetyl-PGP is an increase of expression of cytokine genes Th-1 and 2 type $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ and IL-4.

Key words: *ulser of stomach, stress, glyprolines, cytokines.*

Сведения об авторах

Сангаджиева Анна Джангровна — аспирант, кафедра физиологии человека и животных, биологического факультета МГУ. Тел.: 8-926-832-52-40; e-mail: sanganna@mail.ru

Бакаева Занда Валериевна — канд. биол. наук, доц. кафедры фундаментальной и прикладной физиологии медико-биологического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Тел.: 8-909-151-74-41; e-mail: bakaeva_z@mail.ru

Самонина Галина Ефимовна — докт. биол. наук, проф., вед. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-916-879-34-08; e-mail: g_samonina@mail.ru

Мезенцева Марина Владимировна — докт. биол. наук, зав. лабораторией культур тканей, Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт вирусологии имени Д.И. Иванова Минздрава России. Тел.: 8-916-126-24-20; e-mail: marmez@mail.ru

Андреева Людмила Александровна — руководитель сектора регуляторных пептидов, Институт молекулярной генетики РАН. Тел.: 8-916-576-27-95; e-mail: landr@img.ras.ru

Мясоедов Николай Федорович — акад., докт. хим. наук, проф., заместитель директора по научной работе, Институт молекулярной генетики РАН. Тел.: 8-499-196-00-01; e-mail: nfm@img.ras.ru

УДК 612.821.6

ПРОТЕКТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ НИТРАТА МАГНИЯ НА ИШЕМИЮ МОЗГА

В.С. Кузенков, А.Л. Крушинский

(кафедра физиологии человека и животных; кафедра высшей нервной деятельности;
e-mail: kouzenkov@mail.ru)

Изучено влияние нитрата магния ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) на динамику неврологических нарушений и смертность крыс в результате ишемии мозга, вызванной одномоментной двусторонней перевязкой общих сонных артерий. $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ в дозе 5 мг/1000 г и 50 мг/1000 г, введенный за 60 мин до ишемии мозга и через 1–2 с после окклюзии обеих сонных артерий, достоверно уменьшал тяжесть неврологических нарушений и смертность крыс.

Ключевые слова: ишемия мозга, нитрат магния, оксид азота.

За последнее десятилетие появилось множество научных публикаций, в которых говорится не только о безвредности нитратов и нитритов, но и об их терапевтических свойствах, особенно для сосудистых заболеваний головного мозга [1–2]. Еще в начале XX в. было установлено, что при безнитратной диете в организме все равно присутствуют нитриты (NO_2^-) и нитраты (NO_3^-) [3]. Было замечено, что в странах, где в пищу употребляется много овощей и фруктов, содержащих нитраты и нитриты, наблюдается низкий уровень развития сердечно-сосудистых заболеваний [4–5]. Поэтому исследователи обратили свое внимание на применение нитратов в ишемической патологии мозга, которая имеет широкое распространение и тяжелые последствия для здоровья человека [6]. Также установлено, что нитраты и нитриты являются не инертными продуктами метаболизма оксида азота (NO), а формой хранения NO [7]. Было выяснено, что нитраты и нитриты осуществляют свое положительное влияние на сосудистую систему ишемического мозга через образование NO [8]. Известно, что в условиях ишемии/гипоксии нитрат/нитрит-редуктазы осуществляют последовательную цепь трансформации $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ [9]. Более того, в условиях дефицита кислорода, когда NO-синтаза (NOS) не может синтезировать NO, многие ферменты изменяют направленность своего действия. Например, во время ишемии/гипоксии дезоксигемоглобин и NOS выступают в роли нитритредуктаз [10, 11]. Таким образом, в условиях дефицита кислорода активизируются альтернативные источники образования NO, а субстратом для ферментов являются нитраты и нитриты. Возможно, это древний механизм защиты организма от ишемии/гипоксии, который впоследствии утратил свою ведущую роль, или NOS ошибочно считают ведущим ферментом, синтезирующим NO. Также имеются данные о том, что нитраты и нит-

риты могут оказывать свои протекторные свойства через NO-независимый механизм вследствие их прямого действия на ключевые белки и липиды [12].

В качестве других препаратов, применяемых при ишемическом инсульте, отмечены неорганические формы магния (сульфат или хлорид магния), которые в ряде исследований характеризуются нейропротекторным эффектом [13–14]. Магний — четвертый катион по распространенности в теле человека, второй внутриклеточный катион и является кофактором более 500 белков, участвующих в различных биохимических реакциях и сигнальных каскадах [15, 16]. Как предполагают, магний осуществляет свои нейропротекторные свойства через раннее восстановление клеточных запасов АТФ, антагонизм всех подтипов кальциевых каналов, неконкурентный антагонизм рецепторов NMDA, ингибирование нейротоксического высвобождения глутамата, ингибирование генерации кислородных радикалов и чрезмерного формирования оксидов азота, ингибирование активации провоспалительных цитокинов и т.д. [17, 18]. В экспериментальных и клинических исследованиях применение неорганических препаратов магния уменьшает негативное действие ишемического каскада [19]. В других работах такого эффекта не наблюдали [20, 21]. Исходя из того, что и нитраты, и неорганические препараты магния оказывают протекторное влияние на сосудистую систему мозга, мы решили проверить сочетанное действие этих двух ионов на неполную ишемию мозга.

Цель настоящей работы — изучение влияния неорганических форм магния: нитрата магния ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$), сульфата магния (MgSO_4) и хлорида магния (MgCl_2), введенных в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг внутривенно за 1 ч до ишемии мозга и через 1–2 с после окклюзии общих сонных артерий, на течение ишемического инсульта (ИИ).

Материалы и методы

Для создания модели глобальной ишемии мозга применяли одномоментную двустороннюю перевязку общих сонных артерий. Крысам под эфирным наркозом выделяли и перевязывали общие сонные артерии. Длительность операции составляла не более 10 мин. После эфирного наркоза у крыс быстро восстанавливалось сознание. Животных помещали в отдельные клетки и полуколичественно оценивали динамику неврологического дефицита [23]. Оценивали ограничение подвижности животного, птоз, гиперактивное поведение, насильственные движения (вращения, прыжки, судорожные и вращательные припадки), парезы конечностей, кому и смерть. В соответствии с использованной методикой оценки неврологической симптоматики за 0–3 балла принимали состояние, близкое к нормальному; за 3–6 баллов — среднюю степень; за 7–24 балла — тяжелую степень ИИ; за 25 баллов — смерть животного. Неврологический дефицит оценивали через каждые 30 мин в течение 8 ч. Суммарный балл по каждому промежутку времени усредняли для всех животных в группе. На основе полученных данных строили графики динамики неврологических нарушений, отложив по оси ординат баллы, по оси абсцисс — время.

В экспериментах использовано 448 крыс линии Вистар массой 120–140 г. У всех крыс была произведена окклюзия обеих сонных артерий. Было проведено четыре серии опытов по 112 крыс в каждой серии. В 1-й и 3-й сериях опытов препараты вводились за 1 ч до ишемии мозга, во 2-й и 4-й сериях — через 1–2 с после окклюзии общих сонных артерий. В каждой серии эксперимента животные были разбиты на 4 группы: три опытные и контрольную. Всего было 16 групп по 28 крыс в каждой. Препараты вводились по следующей схеме.

Первой группе — контроль ($n = 28$) внутривенно в те же сроки в эквивалентном объеме вводили физиологический раствор (0,9% NaCl).

Второй группе ($n = 28$) в каждой серии вводили $MgSO_4$ в дозе 5 мг/кг или 50 мг/кг внутривенно

шинно через 1–2 с после окклюзии общих сонных артерий.

Третьей группе ($n = 28$) в каждой серии вводили $MgCl_2$ в дозе 5 мг/кг или 50 мг/кг внутривенно за 1 ч до ишемии мозга и через 1–2 с после окклюзии общих сонных артерий.

Четвертой группе ($n = 28$) в каждой серии вводили $Mg(NO_3)_2$ в дозе 5 мг/кг или 50 мг/кг внутривенно за 1 ч до ишемии мозга и через 1–2 с после окклюзии общих сонных артерий.

Достоверность различий средних параметров в разных экспериментальных группах животных оценивали с помощью критерия Манна–Уитни (U Test) в программе STATISTIKA 6. Для оценки летальности неврологических проявлений применяли критерий Фишера.

Результаты и обсуждение

Влияние $Mg(NO_3)_2$, $MgSO_4$ и $MgCl_2$ в дозах 5 мг/кг, введенных за 1 ч до ишемии мозга, на течение ИИ. Интенсивность нарастания неврологических нарушений в группе крыс, которым вводили $Mg(NO_3)_2$ в дозе 5 мг/кг за 1 ч до окклюзии обеих сонных артерий на протяжении 300–480-й мин опыта, была достоверно ($p < 0,01$) ниже, чем в контрольной группе животных (рис. 1). Смертность в группе 4 была также достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной. Неврологический дефицит в группе 4 $Mg(NO_3)_2$ был достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем в группах, которым вводили $MgSO_4$ и $MgCl_2$ в дозе 5 мг/кг (рис. 1). Смертность в группе 4 была достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем в группах 2 и 3. Достоверных различий между группами 1 и 2 и группами 1 и 3 не наблюдалось (рис. 1).

Влияние $Mg(NO_3)_2$, $MgSO_4$ и $MgCl_2$ в дозах 5 мг/кг, введенных через 1–2 с после ишемии мозга, на течение ИИ. У животных, которым вводили $Mg(NO_3)_2$ в дозе 5 мг/кг через 1–2 с после окклюзии обеих сонных артерий, неврологический дефицит на протяжении 360–480-й мин опыта был достоверно ($p < 0,05$) менее выражен, чем у контрольной группы крыс (рис. 2). Смертность в группе крыс, которой вводили

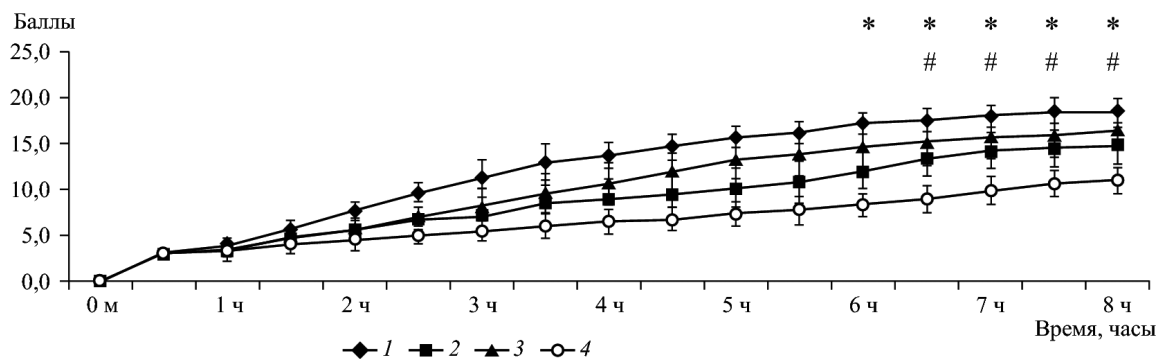


Рис. 1. Влияние $Mg(NO_3)_2$, $MgSO_4$ и $MgCl_2$, введенных за 1 ч до ишемии мозга, на течение ишемического инсульта. 1 — контроль; 2 — $MgSO_4$ в дозе 5 мг/кг; 3 — $MgCl_2$ в дозе 5 мг/кг; 4 — $Mg(NO_3)_2$ в дозе 5 мг/кг. ** $p < 0,01$ — достоверность различий между 4-й и 1-й группами; # $p < 0,05$ — достоверность различий между 2-й, 3-й и 4-й группами

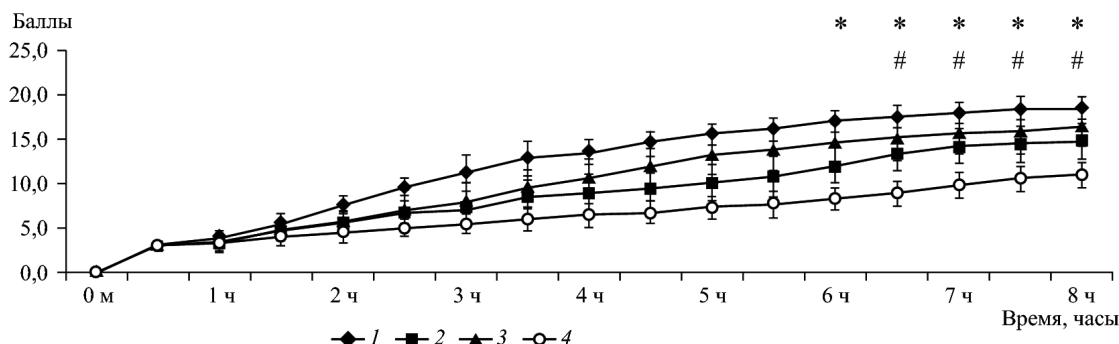


Рис. 2. Влияние $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 и MgCl_2 , введенных 1–2 с после ишемии мозга, на течение ишемического инсульта. 1 — контроль; 2 — MgSO_4 в дозе 5 мг/кг; 3 — MgCl_2 в дозе 5 мг/кг; $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ в дозе 5 мг/кг. ** $p < 0,01$ — достоверность различий между 4-й и 1-й группами; # $p < 0,05$ — достоверность различий между 2-й, 3-й и 4-й группами

ли $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ в дозе 5 мг/кг, была достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной группе животных. У крыс, которым вводили MgSO_4 и MgCl_2 в дозе 5 мг/кг через 1–2 с после ишемии мозга, интенсивность нарастания неврологических нарушений на протяжении 360–480-й мин была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем у крыс, которым вводили $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ в дозе 5 мг/кг (рис. 2). Смертность в группе 4 была достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем в группах 2 и 3. Достоверных различий между группами 1 и 2 и группами 1 и 3 не наблюдалось (рис. 2).

Влияние $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 и MgCl_2 в дозах 50 мг/кг, введенных за 1 ч до ишемии мозга, на течение ИИ. Введение $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ в дозе 50 мг/кг за 1 ч до окклюзии сонных артерий оказывало значительный протекторный эффект, что проявилось в менее интенсивном развитии тяжелой неврологической симптоматики и смертности в этой опытной группе по сравнению с контрольной группой животных. Интенсивность нарастания неврологического дефицита в опытной группе на протяжении 210–480-й мин опыта оказалась достоверно ниже ($p < 0,01$), чем в контрольной группе животных (рис. 3). Смертность в опытной группе крыс была также достоверно ($p < 0,01$) ниже, чем в контрольной группе. По сравнению с животными, которые получали MgSO_4 в дозе 50 мг/кг (2-я груп-

па) и MgCl_2 в дозе 50 мг/кг (3-я группа) до ишемии мозга у крыс, которым вводили $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ в дозе 50 мг/кг за 1 ч до ишемии мозга, неврологическая симптоматика была достоверно ($p < 0,05$) менее выражена на протяжении 399–480-й мин (рис. 3). Смертность в группе 4 также оказалась ниже ($p < 0,05$), чем в группах 2 и 3. Достоверных различий между группами 1 и 2, а также между группами 1 и 3 не наблюдалось, хотя интенсивность нарастания неврологического дефицита в группах 2 и 3 была менее интенсивной, чем в контрольной группе крыс (рис. 3).

Влияние $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 и MgCl_2 в дозах 50 мг/кг, введенных через 1–2 с после ишемии мозга, на течение ИИ. У крыс, которым вводили $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ в дозе 50 мг/кг через 1–2 с после ишемии мозга, неврологический дефицит на протяжении 240–480-й мин был достоверно ($p < 0,01$) менее выражен, чем у контрольной группы крыс (рис. 4). Смертность в группе 4 была достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной. У крыс, которым вводили MgSO_4 и MgCl_2 в дозе 50 мг/кг через 1–2 с после ишемии мозга, интенсивность нарастания неврологических нарушений была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем у крыс, которым вводили $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ в дозе 50 мг/кг (рис. 4). Смертность в группе 4 также была достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем в группах 2 и 3. Достоверных различий

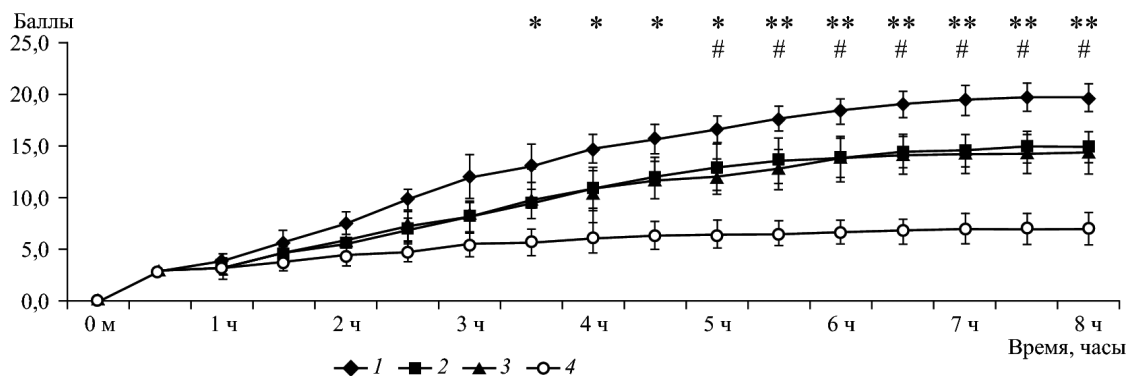


Рис. 3. Влияние $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 и MgCl_2 , введенных за 1 ч до ишемии мозга, на течение ишемического инсульта. 1 — контроль; 2 — MgSO_4 в дозе 50 мг/кг; 3 — MgCl_2 в дозе 50 мг/кг; $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ в дозе 50 мг/кг. * $p < 0,05$ — достоверность различий между 4-й и 1-й группами; ** $p < 0,01$ — достоверность различий между 4-й и 1-й группами; # $p < 0,05$ — достоверность различий между 2-й, 3-й и 4-й группами

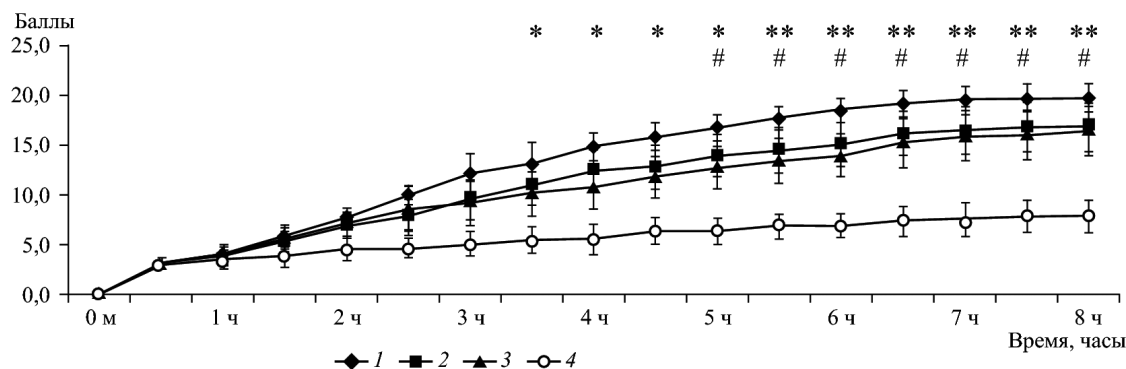


Рис. 4. Влияние $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 и MgCl_2 , введенных 1—2 с после ишемии мозга, на течение ишемического инсульта. 1 — контроль; 2 — MgSO_4 в дозе 50 мг/кг; 3 — MgCl_2 в дозе 50 мг/кг; $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ в дозе 50 мг/кг. * $p < 0,05$ — достоверность различий между 4-й и 1-й группами; ** $p < 0,01$ — достоверность различий между 4-й и 1-й группами; # $p < 0,05$ — достоверность различий между 2-й, 3-й и 4-й группами

между группами 1 и 2 и группами 1 и 3 не наблюдалось (рис. 4).

Обсуждение

В клинических и экспериментальных исследованиях установлено, что применение препаратов магния и нитратов при ишемии головного мозга оказывает протекторный эффект [1, 13, 14]. Поскольку $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ содержит как катион Mg^{2+} , так и анион NO_3^- , то он должен обладать протекторными свойствами как неорганических препаратов магния, так и нитратов.

Действительно, в нашем исследовании применение $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ как в дозе 5 мг/кг, так и в дозе 50 мг/кг сопровождалось достоверным ($p < 0,01$) защитным эффектом. Мы предполагаем, что это может быть связано с трансформацией нитратов в NO. Известно, что при гипоксии/ишемии мозга повышается ферментативная активность нитрат/нитрит-редуктаз, которые осуществляют последовательную цепь трансформации $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ [1, 9]. Будучи сильным вазодилататором, NO способен увеличивать кровоток в мозге и ингибировать агрегацию тромбоцитов [24]. Защитный эффект проявляется уменьшением выраженности неврологического дефицита и снижением летальности. Умеренное увеличение концентрации NO приводит к переходу белков из растворимого в мембранно-связанное состояние [9], что способно повысить стабильность белков и мембран. Протекторный эффект $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, влияющий на ишемию мозга, связан не только с образованием NO, но и с действием катионов Mg^{2+} . Известно, что ионы Mg^{2+} приводят к увеличению производства простагландина I_2 , который в свою очередь уменьшает агрегацию тромбоцитов. Катионы Mg^{2+} блокируют кальциевые каналы, снижают чрезмерный вход ионов Ca^{2+} в клетки, ингибируют NMDA-рецепторы, тем самым уменьшая эксайтотоксичность, способствуют раннему восстановлению клеточных запасов АТФ и ингибируют активацию провоспалительных цитокинов, что может

уменьшить повреждающее действие ишемии и гипоксии мозга [16, 17].

Меньший протекторный эффект $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, взятого в дозе 5 мг/кг, по сравнению с $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, взятого в дозе 50 мг/кг, можно объяснить как меньшей концентрацией катионов Mg^{2+} , так и анионов NO_3^- . В наших экспериментах при введении нитрата натрия NaNO_3 в дозе 5 мг/кг и 50 мг/кг мы также наблюдали зависимость протекторного эффекта нитратов от дозы введения препарата. При введении NaNO_3 в дозе 50 мг/кг он достоверно снижал неврологический дефицит и смертность у крыс, а NaNO_3 , взятый в дозе на порядок меньше (5 мг/кг), не обладал протекторным эффектом [26].

Из рис. 1—4 видно, что неврологический дефицит при введении $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ на протяжении всего эксперимента был меньше, чем в контроле, но только через 3—4 ч после начала наблюдений неврологическая симптоматика стала достоверно ($p < 0,01$) меньше. Вероятно, отсроченное протекторное действие $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ на неполную глобальную ишемию мозга связано с низкой нитрат/нитрит-редуцирующей активностью катиона Mg^{2+} , а значит, с низким образованием NO, который вместе с ионами Mg^{2+} осуществлял протекторное действие $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Для умеренного протекторного накопления NO требуется время. Потенцирующее протекторное взаимодействие NO и Mg^{2+} , вероятно, также играло роль. У неорганических препаратов магния (MgSO_4 и MgCl_2) также есть катион Mg^{2+} , но они не оказывали протекторного влияния на ишемию мозга.

Незначительный недостоверный защитный эффект, который наблюдался при введении MgSO_4 и MgCl_2 , введенных в дозе 5 мг/кг и 50 мг/кг, по-видимому, связан с катионами Mg^{2+} . Из наших результатов следует, что протекторный эффект $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ не зависел от срока введения. Как видно из рис. 1 и 2, введение $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ как за 60 мин до окклюзии сонных артерий, так и введение через 1—2 с после развития ишемии оказывало достоверный протекторный эффект.

Таким образом, результаты нашего эксперимента предполагают, что значительный протекторный эффект $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг на неполную ишемию мозга связан с сочетанным влиянием катионов Mg^{2+} и анионов NO_3^- . Вероятно, неудачи, связанные с применением солей неорганического магния (MgSO_4 и MgCl_2) в медицинской и экспериментальной практике, связаны с противоионом магния, а именно с анионами SO_4^{2-} и Cl^- . Мы предпо-

лагаем, что продолжающиеся экспериментальные и медицинские исследования терапевтических эффектов неорганических препаратов магния будут связаны с изучением эффектов $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Нитрат магния отвечает многим требованиям, предъявляемым к идеальным фармакологическим препаратам: недорогой, доступный, легко вводится и, по всей видимости, без побочных неблагоприятных эффектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Calvert J.W., Lefter D.J. Clinical translation of nitrite therapy for Cardiovascular Diseases // *Nitric Oxide*. 2010. Vol. 22. N 2. P. 91–97.
2. Lundberg J.O., Weitzberg E. NO-synthase independent NO generation in mammals // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. Vol. 396. N 1. P. 39–45.
3. L'hirondel J., L'hirondel J.-L. Nitrate and man: toxic, harmless or beneficial? CABI Publishing, Wallingford & NY, 2001. P. 184.
4. Pluta R.M., Oldfield E.H., Bakhtian K.D., Fathi A.R., Smith R.K., DeVroom H.L., Nahavandi M., Woo S., Figg W.D., Lonser R.R. Safety and feasibility of long-term intravenous sodium nitrite infusion in healthy volunteers // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. N 1. P. 14504.
5. Gupta V.K. Intravenous magnesium for neuroprotection in acute stroke: Clinical hope versus basic neuropharmacology // *Stroke*. 2004. Vol. 35. P. 2758–2759.
6. Kaste M., Norrving B. From the World Stroke Day to the World Stroke Campaign: one in six: act now! // *Int. J. Stroke*. 2010. Vol. 5. P. 342–343.
7. Hord N.G., Tang Y., Bryan N.S. Food sources of nitrites and nitrites: the physiologic context for potential health benefits // *Am. J. Clin. Nutr.* 2009. Vol. 90. N 1. P. 1–10.
8. Dezfulian C., Raat N.J.H., Shiva S., Gladwin M.T. Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics // *Cardiovasc Res*. 2007. Vol. 75. N 2. P. 327–338.
9. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицин Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1997. 156 с.
10. Machha A., Schechter A.N. Dietary nitrite and nitrate: a review of potential mechanisms of cardiovascular benefits // *Eur. J. Nutr.* 2011. Vol. 50. N 5. P. 293–303.
11. Wink D.A., Paolocci N. Mother was right: eat your vegetables and do not spit! When oral nitrate helps with high blood pressure // *Hypertension*. 2008. Vol. 51. P. 617–619.
12. Bryan N.S. Cardioprotective actions of nitrite therapy and dietary considerations // *Front. Biosci.* 2009. Vol. 14. P. 4793–808.
13. Sen A.P., Gulati A. Use of magnesium in traumatic brain injury // *Neurotherapeutics*. 2010. Vol. 7. P. 91–99.
14. Ginsberg M.D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future // *Neuropharmacol.* 2008. Vol. 55. N 3. P. 363–389.
15. Gums J.G. Magnesium in cardiovascular and other disorders // *Amer. J. Health Syst. Pharm.* 2004. Vol. 61. N 15. P. 1569–1576.
16. Muir K.W. Magnesium in stroke treatment // *Postgrad Med. J.* 2002. Vol. 78. P. 641–645.
17. Громова О.А., Торшин И.Ю., Калачаева А.Г., Курамшин Д.Б. Молекулярно-биологические основы нейропротекторных эффектов магния // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2011. Т. 111. С. 12–90.
18. Lin J.Y., Yang D.Y., Cheng F.C. Experimental cerebral ischemia and magnesium // *Clin. Calcium*. 2004. Vol. 14. N 8. P. 15–21.
19. Saver J.L. Targeting the brain: neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke // *Pharmacotherapy*. 2010. Vol. 7. N 2. P. 62–69.
20. Singh H., Jalodia S., Gupta M.S., Talapatra P., Gupta V., Singh I. Role of magnesium sulfate in neuroprotection in acute ischemic stroke // *Ann. Indian Acad. Neurol.* 2012. Vol. 15. N 3. P. 177–180.
21. Aslanyan S., Weir C.J., Muir K.W., Lees K.R. IMAGES Study Investigators. Magnesium for treatment of acute lacunar stroke syndromes: Further analysis of the IMAGES trial // *Stroke* 2007. Vol. 38. P. 1269–1273.
22. Zhu H.D., Martin R., Meloni B., Oltvolgyi C., Moore S., Majda B., Knuckey N. Magnesium sulfate fails to reduce infarct volume following transient focal cerebral ischemia in rats // *Neurosci Res*. 2004. Vol. 49. N 3. P. 347–353.
23. Durukan A., Strbian D., Tatlisumak T. Rodent models of ischemic stroke: a useful tool for stroke drug development // *Curr. Pharm. Des.* 2008. Vol. 14. N 4. P. 359–370.
24. Саркисов К.Ю., Онуц Б., Оеме П. Влияние фрагмента субстанции Р. (3–4) на течение ишемии мозга у крыс с разным типом поведения // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* 1996. Т. 121. № 4. С. 399–403.
25. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemia brain injury // *Trend. Neurosci.* 1997. Vol. 20. P. 132–139.
26. Kouzenkov V.S., Krushinsky A.L., Reutov V.P. Sodium Nitrate Effect on Development of Neurological Deficiency in Rats after Semi-Global Brain Ischemia // *Moscow Univer. Biol. Sci. Bull.* 2011. Vol. 66. N 1. P. 1–5.

SODIUM POTASSIUM EFFECT ON DEVELOPMENT OF NEUROLOGICAL DEFICIENCY IN EXPERIMENTAL MODEL OF BRAIN ISHEMIA

V.S. Kouzenkov, A.L. Krushinsky

Effects of magnesium nitrate $Mg(NO_3)_2$ on the dynamic of neurological disorders after brain ischemia induced by bilateral occlusion of common carotid artery were investigated in rats of Wistar line. $Mg(NO_3)_2$ in dose 5 mg/1000 g and 50 mg/1000 g injected either 60 minutes or just before the bilateral occlusion carotid artery significantly reduced severity of the neurological disorders and death-rate of the rats.

Key words: *brain ischemia, magnesium nitrate, nitric oxide.*

Сведения об авторах

Кузенков Виктор Сергеевич — канд. биол. наук, лаборант-инженер I категории кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-304-81-17; e-mail: kouzenkov@mail.ru

Крушинский Алексей Леонидович — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-238-32-81; e-mail: krushinsky@pochta.ru

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 576.35:57.017.6

О БЕССМЕРТНОЙ ГИДРЕ. ОПЯТЬ

А.Н. Хохлов

(сектор эволюционной цитогеронтологии; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru)

Кратко рассматривается многолетняя история представлений о самом известном “бессмертном” (нестареющем) организме — пресноводной гидре, которая на протяжении многих лет привлекала внимание ученых, занимающихся проблемами старения и долголетия. Отмечается возобновление в последние годы интереса к изучению тонких механизмов, обеспечивающих практически полное отсутствие у этого полипа старения. Подчеркивается, что в основе “бессмертия” гидры лежит неограниченная способность ее стволовых клеток к самообновлению. Именно это обстоятельство позволяет полипу непрерывно заменять “изношенные” клетки организма, сохраняя все его показатели на неизменном уровне в течение практически неограниченного времени. Заключается, что применимость к человеку данных, полученных в геронтологических исследованиях гидры, носит, к сожалению, очень ограниченный характер, ибо у высокоразвитых организмов нормальное функционирование многих важных органов и тканей определяется наличием постмитотических клеток (нейроны, кардиомиоциты и др.), замена которых практически невозможна.

Ключевые слова: пресноводная гидра, старение, продолжительность жизни, клеточная пролиферация, эволюция, стволовые клетки.

IMMORTALITY

A toy which people cry for,
And on their knees apply for,
Dispute, contend and lie for,
And if allowed
Would be right proud
Eternally to die for.

Ambrose Bierce

В январе 2014 г. в журнале “Nature” появилась статья [1], авторы которой, используя соответствующие демографические данные, сравнили возрастные изменения силы смертности и фертильности у 46 видов живых существ (11 млекопитающих, 12 других позвоночных, 10 беспозвоночных, 12 сосудистых растений и одна зеленая водоросль). Основной вывод работы сводился к тому, что у целого ряда видов вероятность смерти не только не увеличивается с возрастом, но и может оставаться неизменной, а иногда даже уменьшаться. При этом теоретические расчеты авторов свидетельствовали о том, что популяция пресноводной гидры *Hydra magnipapillata* может выживать без размножения на протяжении не менее чем 1400 лет, и это позволяет считать ее практически бессмертной. Данная работа вызвала целый всплеск публикаций в средствах массовой информации (газетах, журналах, интернет-изданиях), смысл которых сводился к тому, что вот, мол, теперь ясно, где искать ключ к отмене старения у человека, и именно те механизмы, которые гидра использует для обеспечения “вечной” жизни, мы можем взять на вооружение для борь-

бы за собственное бессмертие. В настоящей статье я хотел бы изложить свою точку зрения на “феномен бессмертной гидры”, которая, к сожалению, значительно отличается от вышеупомянутой.

Однако сначала нужно остановиться на некоторых определениях. Когда мы говорим о бессмертии в биологическом смысле, речь, естественно, идет не об организмах, которые в принципе нельзя убить. Основываясь на классическом определении старения как совокупности возрастных изменений (а это, надо заметить, может быть как накопление, так и исчезновение чего-либо), приводящих к увеличению вероятности смерти [2—7], мы называем бессмертными те организмы, которые не стареют, причем вероятность их естественной гибели практически равна нулю. Такие организмы не надо путать с нестареющими, но обладающими ограниченной (иногда очень небольшой) продолжительностью жизни вследствие того, что их вероятность гибели хотя и не меняется со временем, является достаточно большой. Собственно, именно поэтому из данных работы [1] следует, что даже те виды, вероятность смерти которых уменьшается

со временем (однако остается достаточно высокой), обладают гораздо меньшей продолжительностью жизни, чем гидра.

Пресноводная гидра привлекла внимание естествоиспытателей еще в середине XVIII в. [8, 9] — за 10—20 лет до рождения Моцарта, как верно заметил Вернер Мюллер в своей статье [10], посвященной морфогенезу/формированию структур у гидры. Уже в то время был выявлен огромный регенеративный потенциал этого организма (новая особь может возникнуть даже из 1/100 старой) и было сделано предположение о его практическом бессмертии. Впоследствии интерес к гидре как возможному объекту геронтологических (и не только) исследований неоднократно возрастал и затухал вплоть до 90-х гг. XX в. [11—15]. Особенно большой вклад в понимание того, как функционирует организм гидры, внес бельгийский исследователь Поль Бриан — один из самых крупных специалистов XX в. в области изучения blastogenеза и gametogenеза [16—19].

Как оказалось, пресноводная гидра действительно может избегать и старения и, судя по всему, рака. У нее в определенных условиях вообще нет постмитотических и “состарившихся” (senescent) клеток. В такой ситуации (исключающей необходимость полового размножения) она может жить практически бесконечно, размножаясь почкованием и обладая, как уже упомянуто выше, огромным регенеративным потенциалом. “Выкручивается” гидра, судя по всему, следующим образом [17, 19—21]. Полагается, что так называемые интерстициальные клетки (или просто i-клетки) гидры способны как участвовать в образовании почек, так и давать начало гаметам. Gametogenез у гидры происходит периодически, после чего она вновь может переходить к бесполому размножению. Однако в определенных условиях (изменение температуры окружающей среды) gametogenез затягивается, что приводит к истощению запасов i-клеток, одряхлению особи и ее смерти. Если же этого не происходит, то i-клетки практически вечно могут работать в качестве стволовых. Зона непрерывного роста расположена у гидры под гипостомом. Вновь образованные клетки перемещаются вверх (к гипостому и щупальцам) или вниз (к образующимся почкам и половым железам), а также по стебельку к подошве, через аборальную пору которой выделяются некротические массы. При этом размеры и индивидуальные особенности полипа остаются постоянными. Таким образом, гидра постоянно полностью обновляется, не обременяя себя “состарившимися” клетками.

При старении (см. определение выше) обязательно должно что-то либо накапливаться, либо исчезать. (Кстати, обратное — необязательно. Скажем, у человека лет до 14—15 вероятность смерти практически не меняется, хотя организм претерпевает огромные изменения, но они либо не влияют на вероятность смерти, либо даже уменьшают ее.) У гидры мы можем наблюдать равновесие (steady state) между этими

двумя процессами. С одной стороны, у нее все время образуются “отработанные” клетки, но она их непрерывно сбрасывает. С другой — ее стволовые клетки непрерывно обеспечивают адекватную замену таким “отбросам”. Возможно, именно поэтому во многих статьях гидру называют “вечным эмбрионом” (см., например, [22]).

Новая волна интереса к гидре как бессмертному организму возникла после появления в 1998 г. экспериментальной работы Мартинеса [23], который на протяжении четырех лет анализировал смертность и фертильность в трех когортах *Hydra vulgaris*. При этом гидры размножались только почкованием (хотя периодически у некоторых особей все-таки образовывались спермии и яйцеклетки), а образующееся потомство сразу удалялось из экспериментальной популяции. Оказалось, что на протяжении всего периода наблюдений сила смертности оставалась пренебрежимо малой, а способность к размножению вообще не менялась. Автор сделал вывод о том, что его результаты подтверждают существовавшую на протяжении многих лет гипотезу об отсутствии у гидры старения и ее потенциальном бессмертии.

Статья Мартинеса инициировала появление целого ряда работ либо посвященных попыткам поставить под сомнение его выводы об отсутствии старения у гидры [24], либо направленных на выяснение возможных тонких молекулярно-генетических механизмов, обеспечивающих бессмертие этого организма (см., в частности, [25, 26]). Особенно возросло количество последних после опубликования в 2010 г. многочисленным интернациональным коллективом исследователей данных о расшифрованном геноме *Hydra magnipapillata* [27]. В некоторых публикациях специально подчеркивалось то, уже упомянутое выше, обстоятельство, что у некоторых видов рода *Hydra* (например, *Hydra oligactis*) все-таки наблюдается довольно быстрое старение, которое вызывается изменением температуры окружающей среды, в свою очередь индуцирующим половое размножение [22, 28, 29].

Значительное количество работ, посвященных проблеме бессмертия гидры, опубликовано группой немецких исследователей под руководством Томаса Боша [25, 26, 30—32]. Изучая молекулярно-генетические механизмы, которые определяют неограниченную способность стволовых клеток гидры к самообновлению, они пришли к выводу, что решающую роль в этом явлении играет транскрипционный фактор FoxO. Бош с соавторами провели целый ряд экспериментов на *Hydra vulgaris*, в результате чего им удалось показать, что сверхэкспрессия *foxO* увеличивает интенсивность пролиферации как интерстициальных стволовых клеток, так и стволовых клеток-предшественников, а также активирует гены стволовых клеток в терминально дифференцированных соматических клетках. Даун-регуляция *foxO* приводила к увеличению числа терминально дифференцированных клеток и к резкому уменьшению скорости роста популяции полипов. Кроме того, она вызывала даун-ре-

гуляцию генов стволовых клеток и экспрессии антибактериального пептида AMP. Авторы сделали вывод, что эти результаты свидетельствуют в пользу эволюционно-консервативной роли FoxO в контроле продолжительности жизни у различных организмов от гидры до человека и позволяют пролить свет на механизмы клеточного старения. При этом они ссылались на ряд работ, результаты которых позволяют предположить участие полиморфизма генов FoxO3A или FoxO1A в формировании долголетия у людей [25]. Таким образом, Бош с коллегами предположили, что ген FoxO влияет на продолжительность жизни людей, контролируя пролиферативную активность стволовых клеток, а также процесс терминальной дифференцировки (как и у гидры) [26].

Очевидно, что способность стволовых клеток гидры к постоянному самообновлению действительно является ключевой для обеспечения бессмертия этого полипа. Однако, на мой взгляд, для человека значение этого фактора является весьма ограниченным. Гидра, как и все кишечнополостные, к которым она относится, является чрезвычайно примитивным представителем животного мира. Вместо центральной нервной системы у этого полипа имеются лишь сенсорные и моторные нейроны, связанные в сеть с помощью промежуточных нейронов и ганглиев. Лишь эта система определяет реакцию гидры на внешние стимулы. У нее нет клеток, которые нельзя было бы заменить без ущерба для организма и которые хоть в какой-нибудь степени определяли бы ее индивидуальность. Напротив, у человека значительная часть самых важных органов и тканей состоит из постмитотических (нейроны, кардиомиоциты, эритроциты) или очень медленно делящихся (гепатоциты, фибробласты) клеток. При этом во многих случаях они не делятся или не заменяются на новые не потому, что у организма для этого нет возможностей, а потому, что им **нельзя** делиться или заменяться. Иначе они просто не смогут правильно выполнять возложенные на них функции. Кстати, многие наши клетки (например, кожные фибробласты) сохраняют свой митотический потенциал (“по Хейfliку”) до самой старости [33], не расходуя свои теломеры в процессе непрерывного размножения. Конечно, у стволовых клеток нет проблем с теломеразой, однако даже регенерация мозга или сердца с помощью стволовых (сателлитных) клеток может привести к нарушению необходимых связей нейронов или кардиомиоцитов в этих сложноорганизованных системах. По-видимому, это наша плата эволюции за высокую организацию и интеллект.

В связи со всем этим перспективы увеличения продолжительности жизни людей с помощью манипуляций с FoxO представляются мне весьма туманными. Таким образом можно, по-видимому, лишь уменьшить жизнеспособность человеческого организма за счет подавления пролиферации стволовых клеток и последующего снижения регенеративных возможностей. Однако обратное, с учетом вышесказанного, кажется очень маловероятным, так как стимуляция раз-

множения стволовых клеток, не предусмотренная нашей программой развития, все равно не обеспечит регенерации, скажем, нейронов или кардиомиоцитов. А если и обеспечит, то это может привести к непредсказуемым последствиям вроде уже упомянутого нарушения нормального функционирования соответствующих органов. Не исключено также появление множественных доброкачественных опухолей.

Согласно концепции старения, которой я придерживаюсь, старение является лишь некоторым “побочным продуктом” программы развития [2, 6, 20, 21, 34], реализация которой у высших организмов с необходимостью предполагает появление популяций клеток с очень низкой и даже нулевой пролиферативной активностью, что в определенной степени определяет ограниченную способность соответствующих органов и тканей к регенерации. В то же время именно наличие таких сложноорганизованных популяций высокодифференцированных клеток, совсем не способных или малоспособных к размножению, обеспечивает нормальное функционирование высших животных и человека.

Однако есть основания полагать, что именно ограничение пролиферации или замены клеток, образующих ткани и органы подавляющего большинства многоклеточных организмов, является причиной накопления в них различных стохастически возникающих макромолекулярных повреждений [3, 6, 7, 19–21, 34–40]. При этом наиболее важные из них — это повреждения ДНК (так как повреждение главной матрицы во многих случаях не может быть “отремонтировано”), которые в дальнейшем, через цепь различных событий, ведут к увеличению вероятности смерти организма, т.е. к старению. Чем выше скорость пролиферации клеток (или их замещения вновь образованными), тем легче они должны избегать накопления на уровне всей клеточной популяции указанных повреждений за счет простого “разбавления”. Именно такое “разбавление”, по-видимому, обеспечивает себе гидра за счет непрерывного обновления всех клеток, что и позволяет ей сохранять в определенных условиях свою жизнеспособность на неизменном уровне в течение практически неограниченного времени.

В пользу данной концепции свидетельствуют многочисленные данные, полученные как нами, так и другими исследователями на модели так называемого “стационарного старения” (“stationary phase aging” в англоязычной литературе; накопление “возрастных” повреждений в культивируемых клетках, пролиферация которых заторможена каким-либо способом, лучше всего с помощью контактного торможения). Как оказалось, в рамках этой модельной системы в клетках действительно происходят изменения, сходные с изменениями клеток стареющих многоклеточных организмов: накапливаются одностранные разрывы ДНК и сшивки ДНК-белок, идет деметилирование ДНК, изменяется уровень спонтанных сестринских хроматидных обменов, возникают дефекты структуры клеточ-

ного ядра, изменяется плазматическая мембрана, замедляется стимулированная митогенами пролиферация клеток, ухудшается их способность образовывать колонии, меняется деацетилазная активность цитохрома P-450, в ДНК накапливается известный биомаркер старения 8-оксо-2'-дезоксигуанозин, увеличивается число клеток с бета-галактозидазой pH 6.0 (наиболее часто используемый биомаркер клеточного старения), идет процесс ингибирования поли(ADP-рибозил)ирования белков хроматина и др. (обзор данных см. [6, 7]). Важно, что такие эксперименты можно проводить на клетках самой разной природы, включая нормальные и трансформированные клетки животных и человека [41], бактерии, дрожжи, растительные клетки, микоплазмы и др. Это обстоятельство обеспечивает эволюционный подход к анализу получаемых результатов [42]. Кроме того, “возрастные” изменения в клетках стационарных культур выявляются довольно быстро — как правило, уже через 2—3 недели после начала эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jones O.R., Scheuerlein A., Salguero-Gómez 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. Khokhlov A.N. Does aging need an own program or the existing development program is more than enough? // *Russ. J. Gen. Chem.* 2010. Vol. 80. N 7. P. 1507—1513.
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., Wei L., Li Y., He J. Teaching cytogerontology in Russia and China // *Adv. Gerontol.* 2012. Vol. 25. N 3. P. 513—516.
5. Wei L., Li Y., He J., Khokhlov A.N. Teaching the cell biology of aging at the Harbin Institute of Technology and Moscow State University // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2012. Vol. 67. N 1. P. 13—16.
6. 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.
7. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. Testing of gero-protectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 1. P. 10—14.
8. Trembley A. Mémoires pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce, à bras en forme de cornes. Leiden: Jean & Herman Verbeek, 1744.
9. Galliot B. Hydra, a fruitful model system for 270 years // *Int. J. Dev. Biol.* 2012. Vol. 56. N 6—8. P. 411—423.
10. Müller W.A. Pattern formation in the immortal *Hydra* // *Trends Genet.* 1996. Vol. 12. N 3. P. 91—96.
11. Pearl R., Miner J.R. Experimental studies on the duration of life. XIV. The comparative mortality of certain lower organisms // *Q. Rev. Biol.* 1935. Vol. 10. N 1. P. 60—79.
12. Berrill N.J., Liu C.K. Germplasm, Weismann, and Hydrozoa // *Q. Rev. Biol.* 1948. Vol. 23. N 2. P. 124—132.
13. Loomis W.F., Lenhoff H.M. Growth and sexual differentiation of hydra in mass culture // *J. Exp. Zool.* 1956. Vol. 132. N 3. P. 555—573.
14. Stiven A.E. Concerning the survivorship curve of hydra // *Ecology*. 1962. Vol. 43. N 1. P. 173—174.
15. Forrest H. Immortality and Pearl's survivorship curve for *Hydra* // *Ecology*. 1963. Vol. 44. N 3. P. 609—610.
16. Brien P. The fresh-water hydra // *Amer. Scientist*. 1960. Vol. 48. N 4. P. 348A, 461—475.
17. Brien P. Blastogenese et gametogenese // L'origine de la lignée germinale chez les vertébrés et chez quelques groupes d'invertébrés. Séminaire 1962 / Ed. Wolff E. Paris: Hermann, 1964. P. 19—76.
18. Brien P. Blastogenesis and morphogenesis // *Adv. Morphog.* 1968. Vol. 7. P. 151—203.
19. Хохлов А.Н. Пролиферация и старение // *Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. Сер. “Общие проблемы физико-химической биологии”*. Т. 9. М.: ВИНТИ, 1988. 176 с.
20. Khokhlov A.N. Decline in regeneration during aging: appropriateness or stochasticity? // *Russ. J. Dev. Biol.* 2013. Vol. 44. N 6. P. 336—341.
21. Khokhlov A.N. Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochasticity? // *Biogerontology*. 2013. Vol. 14. N 6. P. 703—708.
22. Martínez D.E., Bridge D. Hydra, the everlasting embryo, confronts aging // *Int. J. Dev. Biol.* 2012. Vol. 56. N 6—8. P. 479—487.
23. Martínez D. Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra // *Exp. Gerontol.* 1998. Vol. 33. N 3. P. 217—225.
24. Estep P.W. Declining asexual reproduction is suggestive of senescence in hydra: comment on Martínez, D., “Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra” // *Exp. Gerontol.* 2010. Vol. 45. N 9. P. 645—646.

25. Boehm A.-M., Khalturin K., Anton-Erxleben F., Hemmrich G., Klostermeier U.C., Lopez-Quintero J.A., Oberg H.H., Puchert M., Rosenstiel P., Wittlieb J., Bosch T.C. FoxO is a critical regulator of stem cell maintenance in immortal *Hydra* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. Vol. 109. N 48. P. 19697–19702.
26. Nebel A., Bosch T.C.G. Evolution of human longevity: lessons from *Hydra* // Aging (Albany NY). 2012. Vol. 4. N 11. P. 730–731.
27. Chapman J.A., Kirkness E.F., Simakov O. et al. The dynamic genome of *Hydra* // Nature. 2010. Vol. 464. N 7288. P. 592–596.
28. Yoshida K., Fujisawa T., Hwang J.S., Ikeo K., Gojobori T. Degeneration after sexual differentiation in hydra and its relevance to the evolution of aging // Gene. 2006. Vol. 385. P. 64–70.
29. Watanabe H., Hoang V.T., Mättner R., Holstein T.W. Immortality and the base of multicellular life: Lessons from cnidarian stem cells // Semin. Cell Dev. Biol. 2009. Vol. 20. N 9. P. 1114–1125.
30. Bosch T.C.G. Stem cells in immortal hydra // Stem cells: from hydra to man. Springer Netherlands, 2008. P. 37–57.
31. Bosch T.C. Hydra and the evolution of stem cells // BioEssays. 2009. Vol. 31. N 4. P. 478–486.
32. Boehm A.M., Rosenstiel P., Bosch T.C. Stem cells and aging from a quasi-immortal point of view // BioEssays. 2013. Vol. 35. N 11. P. 994–1003.
33. Cristofalo V.J., Allen R.G., Pignolo R.J., Martin B.G., Beck J.C. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. N 18. P. 10614–10619.
34. 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.
35. Khokhlov A.N. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992. Vol. 663. P. 475–476.
36. Khokhlov A.N. Cell proliferation restriction: is it the primary cause of aging? // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. Vol. 854. P. 519.
37. Akimov S.S., Khokhlov A.N. Study of “stationary phase aging” of cultured cells under various types of proliferation restriction // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. Vol. 854. P. 520.
38. Хохлов А.Н. Итоги и перспективы цитогеронтологических исследований на современном этапе // Цитология. 2002. Т. 44. № 12. С. 1143–1148.
39. Khokhlov A.N. Cytogerontology at the beginning of the third millennium: from “correlative” to “gist” models // Russ. J. Dev. Biol. 2003. Vol. 34. N 5. P. 321–326.
40. Khokhlov A.N. Evolution of the term “cellular senescence” and its impact on the current cytogerontological research // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 4. P. 158–161.
41. Khokhlov A.N. Can cancer cells age? Stationary cell culture approach to the problem solution // Visualizing of senescent cells in vitro and in vivo. Programme and abstracts (Warsaw, Poland, 15–16 December 2012). Warsaw, 2012. P. 48–49.
42. Khokhlov A.N. Evolutionary cytogerontology as a new branch of experimental gerontology // Age. 1994. Vol. 17. N 4. P. 159.
43. Alinkina E.S., Vorobyova A.K., Misharina T.A., Fatkulina L.D., Burlakova E.B., Khokhlov A.N. Cytogerontological studies of biological activity of oregano essential oil // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 2. P. 52–57.
44. Yablonskaya O.I., Ryndina T.S., Voeikov V.L., Khokhlov A.N. A paradoxical effect of hydrated C₆₀-fullerene at an ultralow concentration on the viability and aging of cultured Chinese hamster cells // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 2. P. 63–68.

Поступила в редакцию
11.05.14

ON THE IMMORTAL HYDRA. AGAIN

A.N. Khokhlov

The long history of ideas about the most famous “immortal” (non-aging) organism, freshwater hydra, is shortly reviewed. Over the years this polyp has attracted the attention of naturalists interested in problems of aging and longevity. In recent years this interest is abruptly increased with the accent on fine mechanisms providing almost complete lack of aging in hydra. It is emphasized that hydra immortality is based on indefinite self-renewal capacity of its stem cells. It is this fact allows polyp to continuously replace “outworn” cells of the organism keeping all its characteristics unchanged for almost unlimited time. It is concluded that the applicability of the data obtained in gerontological experiments on hydra to human being is, unfortunately, very limited because in highly developed organisms normal functioning of many important organs and tissues is determined by the presence of postmitotic cells (neurons, cardiomyocytes, etc.) which actually cannot be replaced.

Key words: *freshwater hydra, aging, life span, cell proliferation, evolution, stem cells.*

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

УДК 612.681

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОСОЦИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ТЕМПЫ СТАРЕНИЯ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ ЖЕНЩИН (НА ПРИМЕРЕ ИЗУЧЕНИЯ ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ г. ТИРАСПОЛЬ)

Н.Е. Лапшина, М.А. Негашева, Р.В. Окушко

(кафедра антропологии; e-mail: afarensis@rambler.ru)

Исследовано влияние ряда биологических (количество детей, возраст рождения первого ребенка, возраст наступления первых менструаций и климакса, продолжительность жизни родителей) и социальных факторов (место жительства, характер трудовой деятельности) на темпы старения женщин пожилого возраста и долгожителей Приднестровья (г. Тирасполь). Оценка биологического возраста и темпов старения проводилась с помощью компьютеризированной программы “Диагностика старения”, включающей набор маркеров функционирования сердечно-сосудистой, дыхательной, нейромышечной систем и др. Для долгожителей характерны более поздние сроки первых родов и более длительный репродуктивный период. Из социальных факторов наибольшая связь с темпами старения и продолжительностью жизни отмечена для характера трудовой деятельности: для женщин, занимающихся трудом с высокой физической нагрузкой, характерны ускоренные темпы старения.

Ключевые слова: биологический возраст, долгожительство, старение, демография.

Увеличение продолжительности жизни и улучшение ее качества — одна из основных проблем, волнующих не только ученых разных специальностей, но и многих людей, переступивших порог 50—60-летнего возраста. Общеизвестно, что в течение жизни в организме человека происходят сложные структурные и функциональные изменения, затрагивающие все уровни его организации. Характер возрастных изменений обусловлен как наследственными, так и социально-экономическими, экологическими и др. факторами [1—13]. Во второй половине XX — начале XXI в. во многих странах мира проводятся комплексные исследования морфофункциональных особенностей долгожителей с изучением степени влияния генетических и биосоциальных факторов на темпы старения в разных популяциях современного населения [14—21]. Так, например, под руководством Томаса Перлса проведено широкомасштабное исследование долгожителей США, перешедших 100-летний рубеж (обследовано 5000 человек из 850 семей) [10—12]. Интегрированный проект “Генетика здорового старения в Европе” объединил исследования гериатров, демографов, генетиков, молекулярных биологов, эпидемиологов и др. из 24 стран Европы и Китая (обследовано более 5300 человек, в том числе 2650 долгожителей старше 90 лет) [15].

Особый интерес для изучения процессов старения представляют лонгитудинальные исследования [16—21]. Одним из самых масштабных проектов в этой области было Фремингемское исследование (Framingham Heart Study), направленное на оценку факторов потенциального риска для сердечно-сосудистых заболеваний. Начиная с 1948 г. на протяжении 50 лет каждые 2 года жители г. Фремингема (штат

Массачусетс, США) принимали участие в медицинском исследовании (оценка состояния здоровья, определение систолического и диастолического артериального давления, уровней холестерина и глюкозы в сыворотке крови, индекса массы тела и др.). Первоначально было обследовано более 5200 человек, к концу эксперимента в 2000 г. осталось 992 участника (319 мужчин и 673 женщины). По результатам исследования наряду с обоснованием факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний была разработана стохастическая модель, включающая несколько концепций старения [17—18].

Одной из фундаментальных характеристик темпов старения организма является биологический возраст (БВ), отражающий степень морфологического и физиологического развития организма и являющийся показателем износа структур или функций отдельных систем или организма в целом. БВ определяется совокупностью обменных, структурных, функциональных, регуляторных и приспособительных особенностей организма и рассматривается как соответствие индивидуального морфофункционального уровня некоторой среднестатистической норме данной популяции [4, 22—25]. Если БВ опережает календарный (паспортный, хронологический) возраст (КВ), это может свидетельствовать о функциональных нарушениях, снижении диапазона адаптации. Многие авторы отмечают ведущую роль для некоторых заболеваний и патологических процессов в организме при ускорении процессов старения [16, 26], другие исследователи придают большое значение условиям среды и образа жизни [19—21, 27—28]. Целью нашей работы было изучение влияния некоторых биологических и социальных факторов на темпы старения

и продолжительность жизни женщин г. Тирасполь. Это исследование проведено в рамках изучения особенностей темпов старения в разных популяциях современного населения на территории России и бывших стран СНГ.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили данные комплексного медико-антропологического обследования 70 женщин в возрасте от 60 до 74 лет и 49 долгожительниц (90 лет — 104 года) — жителей Приднестровья (г. Тирасполь), проведенного осенью 2012 г. при сотрудничестве биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и медицинского факультета Приднестровского государственного университета имени Т.Г. Шевченко. Обследованные женщины по национальности преимущественно русские.

Одной из наиболее современных методик определения биологического возраста, выгодно отличающейся удобством, простотой, малыми финансовыми и временными затратами, является тестирование при помощи компьютеризованных программ “Диагностика старения” [29] и исследовательских комплексов H-Scan [30]. Оценка биологического возраста в данном исследовании проводилась с помощью программы “Диагностика старения. Биовозраст”, включающей набор маркеров функционирования сердечно-сосудистой, дыхательной систем и проч. [29], разработанной Национальным геронтологическим центром (Москва).

Для всех обследованных было проведено анкетирование, по результатам которого изучали влияние социальных факторов на темпы старения и продолжительность жизни. Были проанализированы следующие показатели:

- место жительства (город, село);
- характер работы: физический (в городе или сельской местности) или умственный;
- количество детей;
- возраст при рождении первого ребенка;
- продолжительность жизни отца и матери.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования был проведен сравнительный анализ некоторых биологических и социальных показателей в двух возрастных группах женщин: пожилых (60 лет — 74 года) и долгожительниц (90 лет — 104 года). По многим признакам отчетливых межгрупповых различий не наблюдается. Так, например, в обеих возрастных группах количество женщин из городской и сельской местности было приблизительно одинаковым, что согласуется с результатами других исследователей об отсутствии связи долгожительства с проживанием в городских или сельских условиях [31].

По характеру трудовой деятельности различия между группами незначительны: до выхода на пенсию среди долгожительниц было больше работников умственного труда.

Признак “количество детей” оказывает двойное влияние на женское долгожительство. Он отражает степень биологической “нагрузки” на женский организм, так как роды — самый тяжелый и стрессовый (в данном случае имеется в виду физиологический смысл термина) момент жизни. Количество детей в семье также является показателем социального положения семьи и степени психоэмоциональной нагрузки на женщину.

У долгожительниц в среднем большее количество детей и более поздний возраст рождения первенца (табл. 1). Однако не стоит упускать из внимания тот факт, что на период молодости долгожительниц приходилась Великая Отечественная война (1941—1945 гг.), что не могло не отразиться на заключении браков и рождении детей в этот период.

Возраст наступления первых менструаций у долгожительниц более ранний, чем у обследованных женщин пожилого возраста. При этом возраст наступления менопаузы более поздний, что говорит о более длинном репродуктивном периоде у долгожительниц.

На следующем этапе исследования у пожилых женщин проведена оценка биологического возраста с помощью специального программного обеспечения

Таблица 1

Биологические и социальные характеристики в разных возрастных группах обследованных женщин

Группы обследованных	Количество детей		Возраст при рождении первого ребенка (лет)		Возраст наступления первых менструаций (лет)		Возраст наступления менопаузы* (лет)		Продолжительность жизни отца (лет)		Продолжительность жизни матери (лет)	
	М	S	М	S	М	S	М	S	М	S	М	S
Пожилый возраст (60 лет — 74 года)	1,9	0,7	22,9	4,2	14,1	1,7	45,1	11,9	68,4	12,7	73,1	14,1
Долгожительницы (90 лет — 104 года)	2,3	1,1	24,7	5,6	13,7	2,2	50,6	5,2	70,8	15,7	77,8	17,7

Примечание: М — среднее арифметическое значение, S — среднее квадратичное отклонение, * — достоверные межгрупповые различия при $p < 0,05$.

“Диагностика старения. Биовозраст”. По темпам старения обследованные женщины были разделены на 3 группы: с пониженной скоростью процессов старения ($БВ < КВ - 2$ года), соответствующие своему паспортному возрасту ($БВ = КВ \pm 2$ года) и с повышенными темпами старения ($БВ > КВ + 2$ года). Средний КВ в каждой из трех групп составил примерно 66 лет. Четвертая группа женщин — долгожительницы.

По результатам сравнительного анализа некоторых биологических и социальных показателей в группах женщин с различными темпами старения выявлено, что женщины с замедленными темпами старения в трудоспособном возрасте занимались умственным трудом ($p < 0,05$), работали учителями, библиотекарями, врачами и т.д., что согласуется с данными других исследователей о благоприятном влиянии умственного труда на здоровье пожилых людей [20–21]. Женщины с ускоренными темпами старения чаще других занимались физическим трудом в городе, например работали на заводах.

При сравнении женщин по месту проживания (город, село) отмечено, что ускоренные темпы старения характерны для городских жителей.

В табл. 2 представлены средние значения некоторых биологических и социальных характеристик в группах женщин с разными темпами старения.

Интересным и спорным фактором, влияющим на темпы старения женщин, является возраст рождения первого ребенка и общее количество детей. Существует точка зрения, что отсутствие детей является таким же негативным фактором, как и большое их количество (больше 4) [32]. Ранние роды (до 20 лет) оказывают сильное влияние на женский организм, что позже может вызвать раннее появление заболеваний сердечно-сосудистой и дыхательной систем и как следствие привести к меньшей продолжительности жизни [33]. Более поздние сроки рождения первенца

способствуют замедлению темпов старения [34–38]. Тем не менее существуют работы, опровергающие подобные ассоциации [39], и этот аспект требует дальнейших исследований.

По результатам нашей работы, для женщин со средними темпами старения характерно большее количество детей. Следует отметить сходство этой группы с долгожительницами, у которых также больше 2 детей в семье.

Возраст наступления менопаузы у женщин достоверно связан с наличием беременностей. Если женщина не имела детей, то климакс наступает в более раннем возрасте [40–42]. По результатам нашего исследования, максимальной продолжительностью детородного периода характеризуется группа долгожительниц, у которых возраст менопаузы самый высокий (табл. 2).

Гипотеза генетической предрасположенности к долгожительству может быть проверена разными способами, например непосредственным изучением генов, его определяющих (таковые еще не обнаружены, выявлены лишь гены, полиморфизмы которых потенциально влияют на продолжительность жизни).

Одним из самых распространенных источников получения информации о генетической предрасположенности к долгожительству является изучение генеалогических данных по результатам анкетирования. У обследованных нами долгожительниц продолжительность жизни матери и отца больше, чем в остальных группах женщин (табл. 1), что подтверждает гипотезу о существовании положительной связи между возрастом дожития родителей долгожителей и самих долгожителей [10–11, 34]. В группах женщин с разными темпами старения (ускоренные темпы старения — средние темпы — замедленные темпы старения — долгожительницы) отчетливо прослеживается увеличение средней продолжительности жизни отца: 66,6 лет — 67,5 — 69,7 — 70,8 лет соответственно.

Таблица 2

Биологические и социальные характеристики в группах женщин с разными темпами старения

Группы с разными темпами старения	Количество детей		Возраст при рождении первого ребенка (лет)		Возраст наступления первых менструаций (лет)		Возраст наступления менопаузы* (лет)		Продолжительность жизни отца (лет)		Продолжительность жизни матери (лет)	
	М	S	М	S	М	S	М	S	М	S	М	S
Замедленный темп старения	1,8	0,6	22,6	2,8	13,9	1,6	44,1	13,1	69,7	10,1	70,9	14,4
Соответствие календарному возрасту	2,3	0,9	22,1	3,0	14,6	1,9	44,9	11,7	67,5	15,1	73,7	15,4
Ускоренный темп старения	1,7	0,5	25,4	7,3	13,4	1,3	49,7	4,9	66,6	14,6	77,6	9,6
Долгожительницы	2,3	1,1	24,7	5,6	13,7	2,2	50,6	5,2	70,8	15,7	77,8	17,7

Примечание: М — среднее арифметическое значение, S — среднее квадратичное отклонение, * — достоверные межгрупповые различия при $p < 0,05$.

Заключение

Результаты проведенного исследования показали, что для долгожительниц характерны более поздние сроки первых родов, в их семьях в среднем по 2 ребенка. Также для них отмечен более длительный репродуктивный период и более поздний возраст наступления климакса. Продолжительность жизни матери и отца у долгожительниц больше, чем в остальных группах женщин. Из социальных факторов наибольшая связь с темпами старения и продолжительностью

жизни выявлена для характера трудовой деятельности: для женщин, занимающихся трудом с высокой физической нагрузкой, характерны повышенные темпы старения.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 12-06-00265).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. Т. 1. СПб.: Наука, 2008. 482 с.
2. Москалёв А.А. Старение и гены. СПб.: Наука, 2008. 358 с.
3. Фроликс В.В. Старение и биологические возможности организма. М.: Наука, 1975. 272 с.
4. Хрисанфова Е.Н. Основы геронтологии (антропологические аспекты). М.: Владос, 1999. 151 с.
5. Crews D.E., Garruto R.M. Biological anthropology and aging: Perspectives on human variation over the life span. Oxford: Oxford Univ. Press, 1994. 445 p.
6. Dilman V.M. Development, Aging, and Disease: A New Rationale for an Intervention Strategy. Harwood Academic Publ., 1994. 387 p.
7. Gavrilova N.S., Gavrilov L.A., Severin F.F., Skulachev V.P. Testing predictions of the programmed and stochastic theories of aging: comparison of variation in age at death, menopause, and sexual maturation // *Biochemistry (Mosc)*. 2012. Vol. 77. N 7. P. 754—760.
8. Hayflick L. How and why we age // *Exp. Gerontol*. 1998. Vol. 33. P. 639—653.
9. Olovnikov A.M. Telomeres, telomerase and aging: origin of the theory // *Exp. Gerontol*. 1996. Vol. 31. P. 443—448.
10. Perls T., Kunkel L.M., Puca A.A. The genetics of aging // *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2002. Vol. 12. N 3. P. 362—369.
11. Perls T., Kunkel L.M., Puca A.A. The genetics of exceptional human longevity // *J. Am. Geriatr. Soc*. 2002. Vol. 50. N 2. P. 359—368.
12. Sanders J.L., Minster R.L., Barmada M.M., Matteini A.M., Boudreau R.M., Christensen K., Mayeux R., Borecki I.B., Zhang Q., Perls T., Newman A.B. Heritability of and mortality prediction with a longevity phenotype: the healthy aging index // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*. 2014. Vol. 69. N 4. P. 479—485.
13. Schulz-Aellen M.-F. Aging and human longevity. Boston: Birkhauser, 1997. 283 p.
14. Абхазское долгожительство / Под ред. В.И. Козлова. М.: Наука, 1987. 293 с.
15. Franceschi C. et al. Genetics of healthy aging in Europe: the EU-integrated project GEHA (Genetics of Healthy Aging) // *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2007. Vol. 1100. P. 21—45.
16. Cevenini E., Cotichini R., Stazi M.A., Tucciaceli V., Palmas M.G., Capri M., De Rango F., Dato S., Passarino G., Jeune B., Franceschi C.; GEHA Project Consortium. Health status and 6 years survival of 552 90+ Italian sib-ships recruited within the EU Project GEHA (Genetics of Healthy Ageing) // *Age (Dordr)*. 2014. Vol. 36. N 2. P. 949—966.
17. Arbeev K.G., Akushevich I., Kulminski A.M., Arbeeva L.S., Akushevich L., Ukraintseva S.V., Culminskaya I.V., Yashin A.I. Genetic model for longitudinal studies of aging, health, and longevity and its potential application to incomplete data // *J. Theor. Biol*. 2009. Vol. 258. N 1. P. 103—111.
18. Yashin A.I., Akushevich I.V., Arbeev K.G., Akushevich L., Ukraintseva S.V., Kulminski A. Insights on aging and exceptional longevity from longitudinal data: novel findings from the Framingham Heart Study // *Age (Dordr)*. 2006. Vol. 28. N 4. P. 363—374.
19. Yu P., Song X., Shi J., Mitnitski A., Tang Z., Fang X., Rockwood K. Frailty and survival of older Chinese adults in urban and rural areas: results from the Beijing Longitudinal Study of Aging // *Arch. Gerontol. Geriatr*. 2012. Vol. 54. N 1. P. 3—8.
20. Busse A., Bischoff J., Riedel-Heller S.G., Angermeyer M.C. Mild cognitive impairment: prevalence and incidence according to different diagnostic criteria. Results of the Leipzig Longitudinal Study of the Aged (LEILA75+) // *Br. J. Psychiatry*. 2003. Vol. 182. P. 449—454.
21. Then F.S., Luck T., Lupp M., Thinschmidt M., Decker S., Nieuwenhuisen K., Seidler A., Riedel-Heller S.G. Systematic review of the effect of the psychosocial working environment on cognition and dementia // *Occup. Environ. Med*. 2014. Vol. 71. N 5. P. 358—365.
22. Голубева Е.Ю., Данилова Р.И. Характеристика темпов старения у лиц пожилого возраста на европейском севере России // *Усп. геронтол*. 2012. Т. 25. № 1. С. 45—48.
23. Bulpitt C.J. Assessing biological age: practicality? // *Gerontology*. 1995. Vol. 41. N 6. P. 315—321.
24. Crews D.E. Senescence, aging, and disease // *J. Physiol. Anthropol*. 2007. Vol. 26. N 3. P. 365—372.
25. Dean W., Anacker P.C., Kaufman R.C., Weber H.U. Biological aging measurement: Clinical applications. Los Angeles: Center for Bio-Gerontology, 1988. 426 p.
26. Медведев Н.В., Горишнова Н.К. Значение определения биологического возраста в оценке адаптационных резервов организма при старении // *Усп. совр. естествознания*. 2007. № 12. С. 148—149.
27. Серова Л.Д., Серова Н.Д., Терешина Е.В., Юрина Т.М., Шабалин В.Н. Медико-социальные характеристики долгожителей Москвы и ветеранов Великой Отечественной войны // *Усп. геронтол*. 2011. Т. 24. № 3. С. 505—510.
28. Hughes V., Frontera W., Roubenoff R., Evans W., Singh M. Longitudinal changes in body composition in older men and women: role of body weight change and physical activity // *Am. J. Clin. Nutr*. 2002. Vol. 76. N 2. P. 473—481.

29. Донцов В.И., Крутько В.Н., Гаврилов М.А. Системный подход к количественной диагностике старения человека с применением компьютерной системы "Диагностика старения" // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2010. Т. 9. №. 2. С. 381—387.
30. Назаренко Г.И., Героева И.Б., Кузнецов Е.А., Негашева М.А., Глушков В.П. Новые компьютерные технологии в оценке биологического возраста // Клин. геронт. 2005. Т. 11. № 7. С. 62—67.
31. Татаринова О.В., Никитин Ю.П. Некоторые демографические показатели старения и долгожительства в Якутии // Усп. геронтол. 2008. Т. 21. № 4. С. 525—534.
32. Le Bourg É. Does reproduction decrease longevity in human beings? // Ageing Res. Rev. 2007. Vol. 6. N 2. P. 141—149.
33. Henretta J.C. Early childbearing, marital status, and women's health and mortality after age 50 // J. Health Soc. Behav. 2007. Vol. 48. N 3. P. 254—266.
34. Данилов А.Н., Шульдяков В.А., Малинова Л.И., Ахмадулина Л.Г., Денисова Т.П. Старение и долгожительство населения Поволжского региона // Саратовский науч.-мед. журн. 2012. Т. 8. № 2. С. 242—247.
35. Gagnon A., Smith K.R., Tremblay M., Vézina H., Paré P.P., Desjardins B. Is there a trade-off between fertility and longevity? A comparative study of women from three large historical databases accounting for mortality selection // Am. J. Hum. Biol. 2009. Vol. 21. N 4. P. 533—540.
36. McArdle P.F., Pollin, T.I., O'Connell J.R., Sorkin J.D., Agarwala R., Schäffer A.A., Mitchell B.D. Does having children extend life span? A genealogical study of parity and longevity in the Amish // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 2006. Vol. 61. N 2. P. 190—195.
37. Smith K.R., Mineau G.P., Bean L.L. Fertility and post-reproductive longevity // Biodemography Soc. Biol. 2002. Vol. 49. N 3—4. P. 185—205.
38. Westendorp R.G.J., Kirkwood T.B.L. Human longevity at the cost of reproductive success // Nature. 1998. Vol. 396. N 6713. P. 743—746.
39. Gavrilov L.A., Gavrilova N.S. Is there a reproductive cost for human longevity? // J. Anti Aging Med. 1999. Vol. 2. N 2. P. 121—123.
40. Palmer J.R., Rosenberg L., Wise L.A., Horton N.J., Adams-Campbell L.L. Onset of natural menopause in African American women // Am. J. Public. Health. 2003. Vol. 93. N 2. P. 299—306.
41. Thomas F., Renaud F., Benefice E., De Meeüs T., Guégan J.F. International variability of ages at menarche and menopause: patterns and main determinants // Hum. Biol. 2001. Vol. 73. N 2. P. 271—290.
42. Whelan E.A., Sandler D.P., McConaughy D.R., Weinberg C.R. Menstrual and reproductive characteristics and age at natural menopause // Am. J. Epidemiol. 1990. Vol. 131. N 4. P. 625—632.

Поступила в редакцию
10.09.13

INFLUENCE OF SEVERAL BIOLOGICAL AND SOCIAL FACTORS ON THE RATES OF AGING AND WOMEN LIFESPAN ON THE EXAMPLE OF THE CASE STUDY OF TIRASPOL LONG LIVERS

N.E. Lapshina, M.A. Negasheva, R.V. Okushko

In this study we investigated influence of biological factors (e.g. number of kids, age of first delivery, age of reaching menarche and climax, life-span of their parents) and social (e.g. place of living, nature of work) on rates of aging of elderly and long-living women in Transnistria (Tiraspol). Biological age and rates of aging were evaluated using "Ageing Diagnostics" software, which includes a set of functional characteristics for cardio-vascular, respiratory, neuromuscular system and other data. For long-living women, later terms of the first delivery and longer reproductive period are typical. As for the social factors, the closest relation with the rate of aging and life-span is noted for the character of professional activity: for women involved in work with high physical load, accelerated aging rates are usual.

Key words: *biological age, longevity, aging, demography.*

Сведения об авторах

Лапшина Наталья Евгеньевна — аспирант кафедры антропологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-46; e-mail: afarensis@rambler.ru

Негашева Марина Анатольевна — докт. биол. наук, проф. кафедры антропологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-46; e-mail: negasheva@mail.ru

Окушко Ростислав Владимирович — канд. мед. наук, декан медицинского факультета Приднестровского государственного университета им. Т.Г. Шевченко (г. Тирасполь). E-mail: rovluk@mail.ru

БИОФИЗИКА

УДК 577.3

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ НЕЙРОНА
МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОЙ ФАЗОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Т.А. Казакова, С.М. Новиков, Г.Г. Левин*, Г.В. Максимов

(кафедра биофизики; e-mail: brindikova@gmail.com)

С помощью лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) разработан подход для исследования состояния плазматической мембраны (ПМ) и примембранной области цитоплазмы (ПОЦ) нейрона (позвоночных и беспозвоночных животных). Обнаружены изменения состояния ПМ и ПОЦ нейронов в покое и при модификации функционального состояния нейрона (ацетилхолин). Разработана методика оценки кинетики изменений ПМ и ПОЦ в разных участках нейрона. Обнаружены регулярные процессы ПМ и ПОЦ, частота которых зависит от функционального состояния нейронов. Предполагается, что флуктуации зависят от изменений рельефа ПМ, перестройки примембранного цитоскелета и движения внутриклеточных везикул в ПОЦ нейрона.

Ключевые слова: лазерная интерференционная микроскопия, нейрон, мембранный потенциал, ацетилхолин.

Одним из важнейших объектов исследования, функционирование которого лежит в основе координации жизнедеятельности всех животных, включая человека, является нервная клетка, трансформация возбуждения между нейронами за счет генерации потенциалов действия и ритмическое возбуждение. Генерация потенциала действия (ПД) и ритмическое возбуждение (РВ) нервной клетки обусловлены как активацией потенциал-зависимых каналов и транспортных АТФаз, так и изменениями физико-химических свойств плазматической мембраны (ПМ) (поверхностный заряд, вязкость), а также примембранной области цитоплазмы (ПОЦ). При РВ нервной клеткой запускаются динамические процессы в цитоплазме, приводящие к изменению объема клетки и состояния ПМ [1, 2].

Известно, что состояние ПМ нейрона (Retzius-нейрон пиявки) зависит от межклеточной концентрации медиаторов (ацетилхолина (АХ), серотонина (5-НТ), глутамата и др.) [3]. Важно, что изменения ПОЦ (экзоцитоз 5-НТ) сопровождаются слиянием внутриклеточных везикул с ПМ, изменением ее вязкости и уровня мембраносвязанного Ca^{2+} . Так, при экстраклеточном действии АХ на R-клетку наблюдается увеличение вязкости мембраны, что обусловлено активацией АХ-рецепторов, входом Ca^{2+} и активацией фосфолипаз. Таким образом, проведение РВ в нейронах напрямую приводит к изменению состояния как клеточной мембраны, так и примембранной цитоплазмы [4, 5].

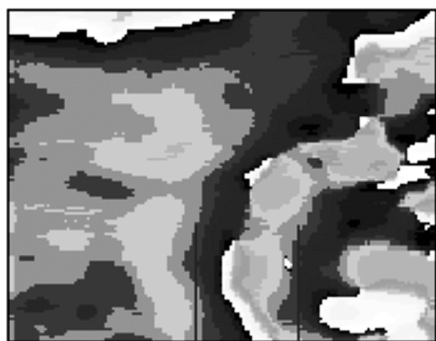
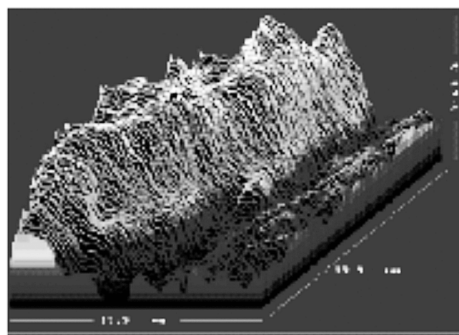
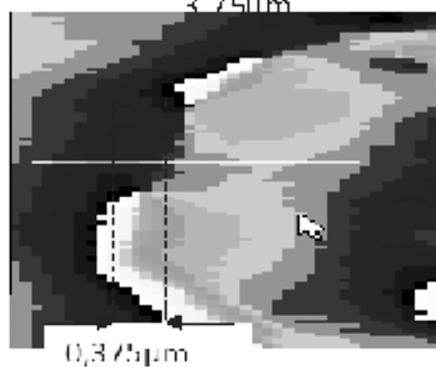
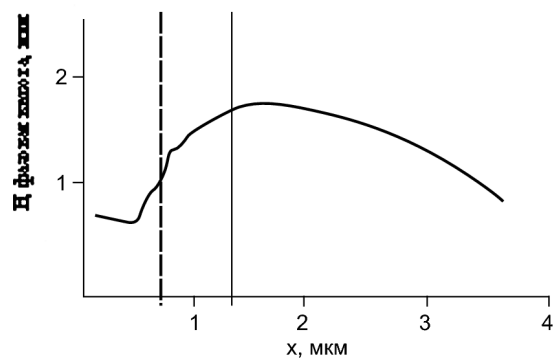
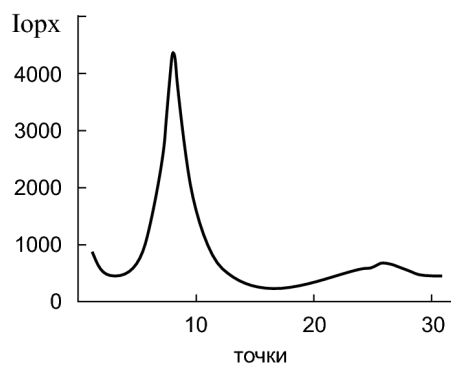
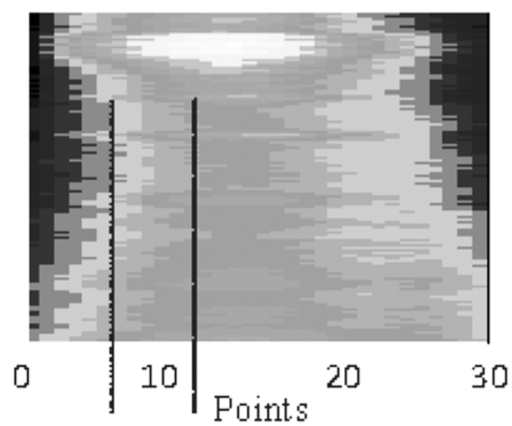
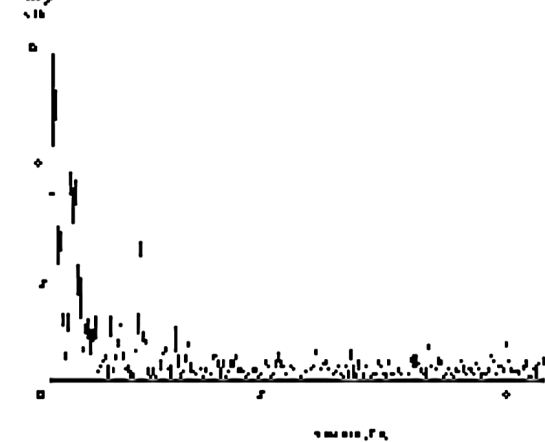
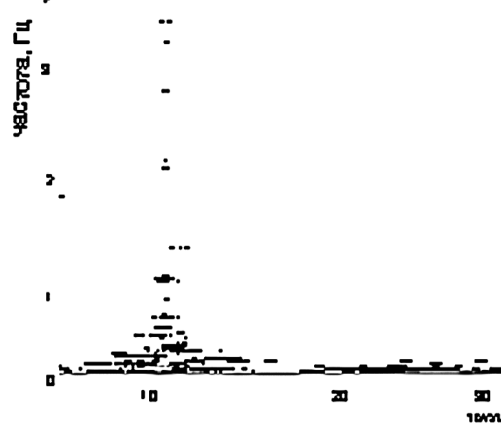
Специфика нервной клетки для исследования заключается в исключительной зависимости ее функционального состояния и клеточной динамики от метода исследования. Как правило, для изучения состояния ПМ и ПОЦ используются методы флуоресцентной и ЭПР-спектроскопии, что сопряжено с введением в клетку молекулярных зондов, нарушающих структуру клеточной мембраны и изменяющих состояние цитоплазмы. В наших исследованиях использовался метод лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ), позволяющий исследовать состояния ПМ и ПОЦ нейрона без изменения структуры и нарушения механизмов функционирования.

Цель настоящей работы заключалась в разработке подходов измерения оптических свойств мембраны и примембранной цитоплазмы при различном функциональном состоянии нейронов.

Материалы и методы

Объектом исследования служили выделенные нейроны из сегментных ганглиев пиявки (*Herudo medicinalis*) и культура нейронов из спинного мозга эмбрионов мыши. Нейроны помещали в герметичную камеру и инкубировали в растворе (среда-1): 115 mM NaCl; 4 mM KCl; 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , pH 7,4 при комнатной температуре [4]. Перед экспериментом проводились измерения флуктуаций фазовой высоты (ФВ) на подложке, а затем — измерения самого объекта. В связи с задачей исследования в ряде экспериментов производили замену среды-1 на рас-

* Всероссийский НИИ оптико-физических измерений.

a*б**в**г**д**е**ж**з*

твор (среда-2): 80 mM NaCl; 50 mM KCl; 1 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂, pH 7,4, при комнатной температуре или раствор (среда-3), содержащий среду-1 и 10⁻¹⁰ M ацетилхолин, а также раствор (среда-4), содержащий среду-1 и 10⁻⁴ M тетраэтиламмоний. Для нейронов мыши раствор содержал: буфер HEPES pH 7,4; 137 mM NaCl; 5,35 mM KCl; 2,2 mM KH₂PO₄; 16,6 mM glucose; 9,8 mM HEPES [6].

Исследования оптических свойств мембраны и примембранной цитоплазмы при различном функциональном состоянии нейронов проводили методом ЛИМ [7, 8]. В экспериментах использовались специальные герметичные термостатируемые камеры, в которых осуществлялась перфузия раствора, без изменения положения объекта. В качестве источника излучения использовали He-Ne лазер (633 нм, 1,5 мВт.). Линейно-периодическая модуляция фазы опорной волны осуществлялась зеркалом с помощью пьезопреобразователя (частота 1 КГц). Для регистрации интерференционного сигнала и его аналого-цифрового преобразования использовался координатночувствительный фотоприемник-диссектор (устройство, состоящее из фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), отклоняющих катушек и электронного блока). Величина фазовой высоты, соответствующая измеряемой оптической плотности (в нм), регистрировалась с чувствительностью 0,5 нм, периодичность выборки и скорость ввода изображения определялись частотой модуляции 1 КГц (или 0,9 мс на пикс).

Принцип действия ЛИМ основан на измерении локальных фаз света, отраженного объектом [9]. Лазерный луч разделяется на два, один из которых, проходя через клетку, отражается от зеркальной подложки, на которой находится клетка (отраженный луч). Другой луч является контрольным и не проходит через объект, а отражается от зеркала пьезопреобразователя (опорный луч). Рассеянный объектом луч в плоскости фотоприемника интерферирует с опорным лучом и создает в фотоприемнике распределение фототоков, что формирует интерференционную картину (фазовое изображение объекта). При построении фазового изображения сигнал нормировался по длине волны, определялась величина оптической разности хода (ОРХ) двух лучей, иначе называемая фазовой высотой (Ф):

$$\Phi = \frac{(\varphi_0 - \varphi_{obj}) \lambda}{2\pi} \quad (1)$$

где φ_0 — начальная фаза, рад, φ_{obj} — сдвиг фазы объектом, рад, λ — длина волны источника, нм.

В общем случае фазовая высота Φ в каждой точке объекта связана с его геометрическими размерами (толщиной), z [9].

$$\Phi(x, y) = \int_0^{z_{\max}} (n(x, y, z) - n_1) dz, \quad (2)$$

где n_1 — показатель преломления буферного раствора, величина которого постоянна, $n(x, y, z)$ — величина показателя преломления в точке клетки с координатами x, y высотой z , $z_{\max}$ — верхний предел интегрирования, выбирается выше верхней точки объекта.

Таким образом, фазовое изображение клетки представляет собой распределение фазового сдвига в различных областях объекта, а значение фазовой высоты в каждой точке (i) представляет собой сумму высот различных оптических сред (z), где n — коэффициенты преломления соответствующей среды [10]:

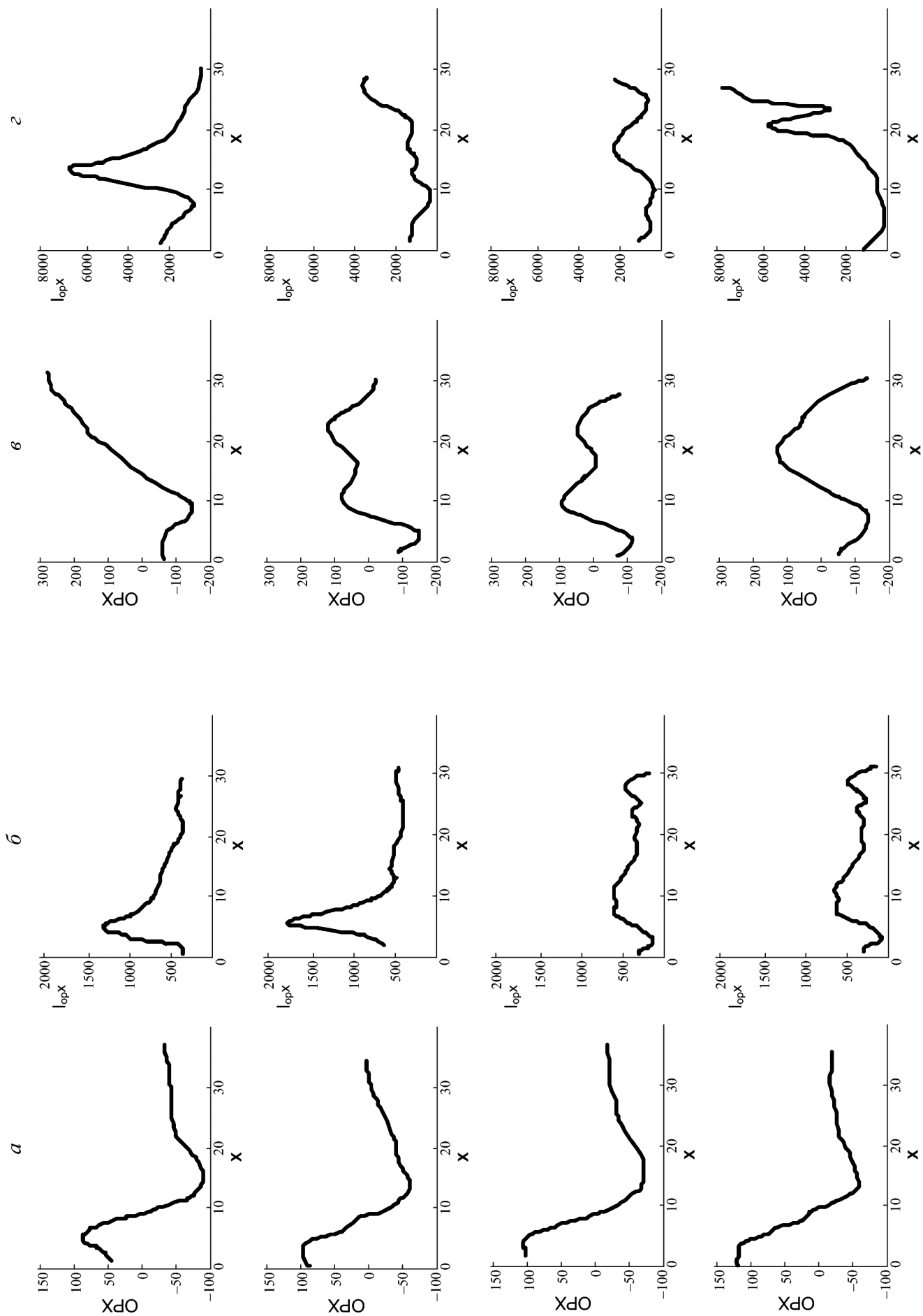
$$\Phi_i = (n_1^i z_1^i + n_2^i z_2^i + \dots + n_n^i z_n^i) - n_1 z. \quad (3)$$

Результаты и обсуждение

Полученное с помощью ЛИМ изображение нейрона представляет собой фазовый портрет или профиль объекта (рис. 1, а). Исходя из полученных значений фазовой высоты объекта формируется трехмерное изображение клетки (рис. 1, б). Установлено, что фазовое изображение клетки характеризуется рельефом, связанным с неравномерным распределением структур с различным коэффициентом преломления в цитоплазме клетки (лизосомы, митохондрии, ядро и т.д.) или остатками тканей и других клеток на поверхности клеточной мембраны (для сохранения нативного состояния плазматической мембраны при выделении клеток проназу не использовали).

При анализе изображения выбирали участок сканирования клетки (скан-линия 3,75 мкм), включающий в себя примембранную цитоплазму, участок мембраны и участок экстраклеточной среды, прилегающий к мембране (рис. 1, а—г). Фазовое изображение нейрона получали каждые 64—65 с (рис. 2, а). Установлено, что максимальное значение фазовой высоты наблюдается именно в примембранной области нейрона (рис. 1, г). Фазовое изображение нейрона меняется во времени и зависит от состояния клетки (рис. 3, в). Изменения фазовой высоты в области цитоплазмы нейрона связаны с изменениями

Рис. 1. Фазовые изображения, получаемые при работе методом ЛИМ. а — фазовый портрет участка клетки (справа) и линия по которой проводилось сканирование; б — трехмерное восстановление профиля клетки; в — увеличенное фазовое изображение линии сканирования; г — фазовый профиль по линии сканирования; д — ($I_{\text{орх}}$) пунктирными линиями обозначен участок на фазовом профиле клетки, соответствующий наиболее интенсивным изменениям профиля; е — сканирование выбранного участка во времени, пунктирными линиями обозначен участок на фазовом профиле клетки, соответствующий наиболее интенсивным изменениям профиля; ж — Фурье-анализ в выбранных точках, выделяются характерные частоты флуктуаций фазового профиля; з — распределение частот по всей линии сканирования



ми коэффициента преломления отдельных компонентов цитоплазмы клетки и, вероятно, зависят от мембранного потенциала, структуры примембранного слоя, цитоскелета, а также движения внутриклеточных везикул.

Установлено, что изменения фазового профиля нейрона не связаны с увеличением или уменьшением объема клетки (рис. 2), так как при этом смещения фазового профиля в экстраклеточную область не наблюдается. Однако при активации АХ-рецепторов (инкубация нейронов в среде с ацетилхолином) наблюдалось смещение фазового профиля в экстраклеточную область (рис. 3), что, по-видимому, свидетельствует об увеличении объема клетки или изменении складчатости рельефа мембраны нейрона.

В процессе анализа фазовых изображений регистрировали участки с максимальными амплитудами изменений ОРХ ($I_{орх}$, рис. 2 и 3). Установлено, что кинетика изменения $I_{орх}$ может быть разной (т.е. максимум $I_{орх}$ может смещаться вдоль сечения клетки, при этом может происходить уширение кривой $I_{орх}$ и появление дополнительных максимумов). Эти явления наиболее выражены при действии на клетку ацетилхолина (рис. 1, в—з).

При исследовании характера изменений фазового профиля (рис. 1, е) были выявлены регулярные изменения фазового профиля во времени в каждой точке с максимальным $I_{орх}$. Установлено, что в контроле изменения фазового профиля осуществляются с разной частотой, а при изменении функционального состояния нейрона меняется и частота изменений фазового профиля и $I_{орх}$.

Итак, в примембранной области цитоплазмы (менее 370 нм) нами выявлена локальная область с максимальной динамикой изменений высоты фазового профиля. При действии на клетку ацетилхолина эта область смещалась, что связано с изменениями объема клетки или складчатости мембраны нейрона.

С помощью фурье-анализа было установлено, что регулярные изменения высоты фазового профиля (ФП) связаны только с примембранной областью цитоплазмы, а в цитоплазме отсутствуют. Характерные флуктуации высоты фазового профиля в ПОЦ нейрона варьировали в интервале от 0,3 до 15 Гц. Наиболее вероятными были изменения в области 0,3—3 Гц, 4—6 Гц, 8—10 Гц и 13—15 Гц, а также в диапазоне частот от 0,3 до 3,0 Гц. Отметим, что

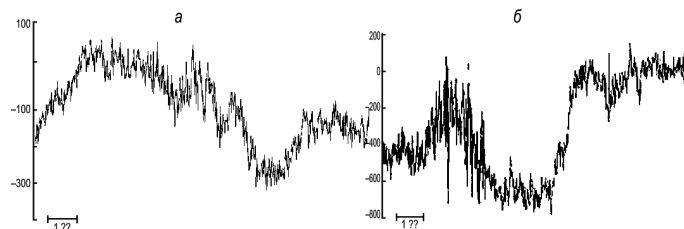


Рис. 3. Изменение высоты фазового профиля во времени в области с наибольшей $I_{орх}$ (в одной точке из линии сканирования) в контроле (а) и после добавления ацетилхолина (б). Видны регулярные изменения высоты фазового профиля. Стрелкой указан момент добавления ацетилхолина (АХ) в систему. Видно, что амплитуда колебаний профиля значительно больше, чем в контроле, особенно большая амплитуда сразу после добавления АХ

область частот, обусловленных “шумом” прибора, находится в диапазоне от 0 до 0,5 Гц.

Обнаруженные изменения высоты фазового профиля нейрона в покое могут быть связаны с регулярными изменениями вязкости самой ПМ или подвижности связанных с ней цитоплазматических структур, а также различных процессов в ПОЦ (циклозис) [11]. При изменениях функционального состояния нейрона (действие АХ) вероятность проявления флуктуаций фазового профиля возрастала в области частот: 0,5—0,7 Гц; 0,9—1,0 Гц; 1,3—1,5 Гц; 1,7—2,1 Гц; 2,3—2,5 Гц и 2,9—3,0 Гц. При этом выявлено снижение вероятности флуктуаций на частотах 0,8; 1,2; 1,6; 2,2; 2,7 Гц.

Для культуры нейронов из спинного мозга эмбрионов мыши были обнаружены следующие характерные частоты флуктуаций фазового профиля нейрона: 0,4—0,8 Гц; 1,4—1,8 Гц, а также 2,4—2,6 Гц (рис. 4). Важно, что частоты 0,4—0,6, а также 1,6 Гц коррелируют с частотой биоэлектрической активности этих нейронов. При изменениях функционального состояния нейронов мыши, вызванной ацетилхолином, увеличилось число регулярных процессов: росла вероятность появления процессов с частотами 0,6 и 1,8 Гц. Снизилась вероятность появления регулярных изменений с частотами 1,6 и 2,4 Гц. Анализ результатов, полученных в ходе исследования изменений, вызванных действием АХ, на двух типах клеток (нейронов позвоночных и беспозвоночных) свидетельствует, что вероятность проявления флуктуаций с частотами 0,6 и 1,8 Гц для обоих типов нейронов возрастает, а процессов с частотой 1,6 Гц,

Рис. 2. Правая часть графика: линия сканирования захватывает участок экстраклеточного пространства. а — изменение фазового профиля Retzius-нейрона по линии сканирования; б — изменение интенсивности изменений ОРХ ($I_{орх}$) при нормальном функционировании нейрона.

Левая часть графика: линия сканирования захватывает мембрану нейрона и участок примембранной цитоплазмы. а — незначительные изменения рельефа фазового профиля без смещения по оси x; б — флуктуации ($I_{орх}$), соответствующие области мембраны и примембранной цитоплазмы; в — изменение фазового профиля Rz-клетки по линии сканирования; г — интенсивности изменений ОРХ ($I_{орх}$) при инкубации с раствором ацетилхолина (мембрана и участок примембранной цитоплазмы — правая часть графика, экстраклеточная среда — левая). Изменения рельефа фазового профиля со смещением вдоль оси x (в), свидетельствуют об изменении объема нейрона. Флуктуации ($I_{орх}$) со сдвигом вдоль оси x (г), свидетельствуют о смещении области максимальных изменений фазового профиля в различные участки клетки

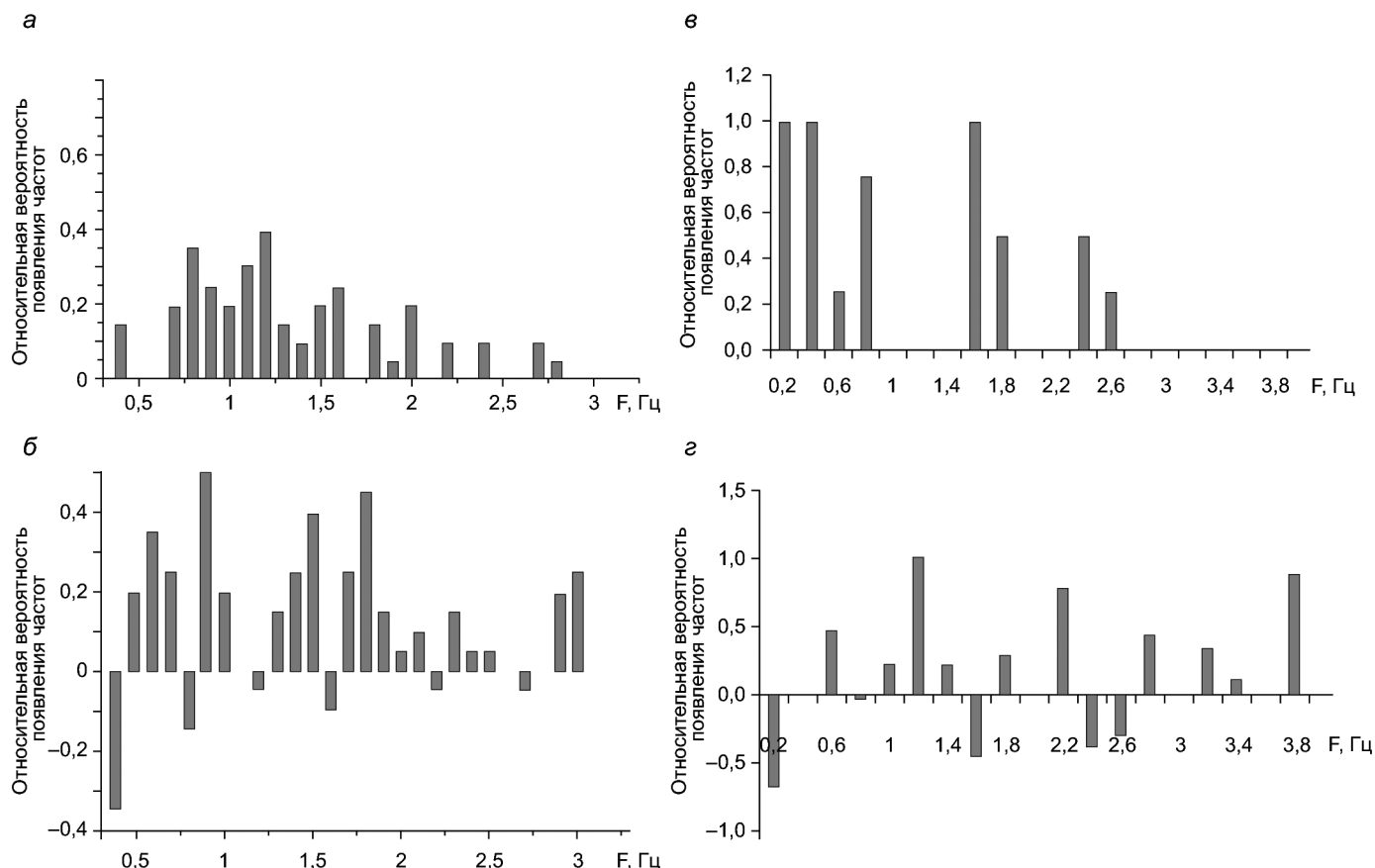


Рис. 4. Характерные частоты изменений высоты фазового профиля мембраны нейрона пиявки (а) и мыши (в) в контроле и при действии ацетилхолина (б, г соответственно) (разностная гистограмма)

характерных для функционирования нейронов в нормальном состоянии, снижается.

Итак, нами разработан подход для оценки состояния ПМ и ПОЦ нейронов позвоночных и беспозвоночных с применением метода лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ). Обнаружены изменения состояния ПМ и ПОЦ нейронов в покое и при модификации функционального состояния клетки с помощью нейромедиаторов (ацетилхолин). Разработана методика оценки интенсивности

этих изменений в разных участках нейрона и проведена оценка состояния ПМ и ПОЦ нейронов во времени. Обнаружены регулярные процессы ПМ и ПОЦ, частота которых зависит от функционального состояния нейрона. Вероятно, эти флуктуации обусловлены изменениями рельефа мембраны при перестройке примембранного цитоскелета и движении внутриклеточных везикул в примембранной области цитоплазмы нейрона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Salanki J. Neuro biology of anvertebrates. Budapest, 1973. P. 252.
2. Monnier A.M.S.R. Soc. Science Biol. Ses. Fial. 1933. Vol. 114. P. 1295—1297.
3. De Robertis E. Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region // Science. 1967. Vol. 156. N 3777. P. 907—914.
4. Ревин В.В., Максимов Г.В., Раденович Ч.Н. Физиология и биофизика мембранных процессов. Саранск: Мордовский ГУ, 1995. 96 с.
5. Chatterjee S, Brindikova T.A, Maksimov G.V, Revn V.V. Investigation of the role of acetylcholine in regulation of axon and Schwann cell interaction during nerve excitation // Eur. Biophys. J. 2000. Vol. 29. N 4—5. P. 353.
6. Naciff J.M., Behbehani M.M., Kaetzel M.A., Dedman J.R. Annexin VI modulates Ca^{2+} and K^{+} conductances of spinal cord and dorsal root ganglion neurons // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1996. Vol. 271. P. 2004—2015.
7. Tychinsky V.P., Yagudzinsky L.S., Leterrier J.-F., Odenso-Leterrier M., Weiss D.G. Real-time measurements of mitochondrial activity using the dynamic phase microscope method // Eur. J. Cell Biol. 1999. Vol. 58. N 3. P. 107—116.
8. Тычинский В.П., Куфаль Г.Э., Одинцов А.А., Вышинская Т.В. Измерения субмикронных структур на лазерном фазовом микроскопе “Эйрискан” // Квантовая электроника. 1997. Т. 27. С. 8.
9. Bennet A.H., Osterberg H., Jupnik H., Richards O.W. Phase microscopy. Principles and applications. N.Y.: John Wiley and Sons, Inc., 1951. 320 p.

10. Вишняков Г.Н., Левин Г.Г. Томографический микроскоп Линника для исследования оптически прозрачных объектов // Измерительная техника. 1998. № 10. С. 18—22.

11. Юсипович А.И., Новиков С.М., Казакова Т.А., Ерохова Л.А., Бразе Н.А., Лазарев Г.Л., Максимов Г.В. Особенности исследования изолированного нейрона методом лазерной интерференционной микроскопии // Квант. электроника. 2006. № 36. С. 874—878.

12. Камия Н. Движение протоплазмы. М.: Иностранная литература, 1962. 676 с.

13. Brazhe A.R., Brazhe N.A., Rodionova N.N., Yusipovich A.I., Ignatyev P.S., Maksimov G.V., Mosekilde E., Sosnovtseva O.V. Non-invasive study of nerve fibres using laser interference microscopy // Philos. Transact. Math. Phys. Eng. Sci. 2008. Vol. 366. N 1880. P. 3463—3481.

14. Brazhe A.R., Brazhe N.A., Maksimov G.V., Ignatyev P.S., Rubin A.B., Mosekilde E., Sosnovtseva O.V. Phase-modulation laser interference microscopy: an advance in cell imaging and dynamics study // J. Biomed. Opt. 2008. Vol. 13. N 3. P. 034004.

15. Brazhe N.A., Brazhe A.R., Pavlov A.N., Erokhova L.A., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Mosekilde E., Sosnovtseva O.V. Unraveling cell processes: interference imaging interwoven with data analysis // J. Biol. Phys. 2006. Vol. 32. N 3—4. P. 191—208.

16. Chizh B.A., Headley P.M., Paton J.F. Coupling of sympathetic and somatic motor outflows from the spinal cord in a perfused preparation of adult mouse in vitro // J. Physiol. 1998. Vol. 508. N 3. P. 907—918.

Поступила в редакцию
21.02.13

USING THE DYNAMIC PHASE MICROSCOPY FOR NEURON CYTOPLASM STUDIES

T.A. Kazakova, S.M. Novikov, G.G. Levin, G.V. Maksimov

Using laser interference microscopy (LIM) an approach to study the state of the plasma membrane (PM) and cytoplasmic-membrane region neuron (vertebrates and invertebrates) was developed. The changes of the PM and neurons cytoplasm state at rest and during the modification of the functioning (a neurotransmitter, acetylcholine) was studied. The method for evaluation of the kinetics of changes in PM and neurons cytoplasm in different parts of the cell was elaborate. Regular PM and neurons cytoplasm processes, the frequency of which depends on the functional state of the neurons was found. It was suggested that the fluctuations depend on the PM relief changes, the restructuring of cytoskeleton-membrane and movement of intracellular vesicles in neurons cytoplasm.

Key words: *laser interference microscopy, neuron, membrane potentiation, acetylcholine.*

Сведения об авторах

Казакова Татьяна Александровна — инженер кафедры биофизики биологического факультета МГУ. E-mail: brindikova@gmail.com

Новиков Сергей Михайлович — науч. сотр. центра совместных исследований Технологического парка де Сан-Себастьян.

Левин Геннадий Генрихович — докт. физ.-хим. наук, проф. НИИ ОФИ.

Максимов Георгий Владимирович — докт. биол. наук, проф. кафедры биофизики биологического факультета МГУ, зав. кафедрой биологического факультета МГК имени Огарева (Саранск). E-mail: gmaximov@mail.ru

ЭКОЛОГИЯ

УДК 630*161.32:582.47

ФОТОСИНТЕЗ У ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ В ЛЕСНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПОЛИГОНА “ЛОГ ТАЕЖНЫЙ”

А.К. Юзбеков, Д.Г. Замолотчиков, А.И. Иващенко

(кафедра общей экологии; e-mail: uak2003@mail.ru)

Исследована сезонная динамика максимальной интенсивности нетто-фотосинтеза и темнового дыхания ели европейской (*Picea abies* L.), отражающая воздействие комплекса внешних факторов и представляющая собой данные, необходимые для оценки фотосинтеза древостоя ели. Выявлено отсутствие в июне внутрисезонной депрессии фотосинтеза. Установлена зависимость между максимальными значениями интенсивности фотосинтеза и температурой воздуха: сезонный максимум нетто-фотосинтеза у ели наблюдался в июле при температуре около 20 °С; в августе и сентябре с понижением оптимума температуры отмечено уменьшение уровня интенсивности ассимиляции CO₂. Положительный фотосинтетический углекислотный баланс свидетельствует о том, что древостой старовозрастных ельников в лесных экосистемах экспериментального полигона “Лог Таежный” является резервуаром для стока углерода.

Ключевые слова: сезонная динамика, ель европейская, нетто-фотосинтез, дыхание, температура, лесные экосистемы.

В последние годы в связи с проблемой глобального изменения климата изучение стоков и эмиссий парниковых газов в природных ландшафтах представляется весьма актуальным: если размеры углеродных пулов в лесной экосистеме увеличиваются, то создается сток углекислого газа из атмосферы, если уменьшаются, то в конечном итоге образуются источники парниковых газов. Согласно Рамочной конвенции ООН об изменении климата (РКИК ООН), лесам, как основным поглотителям парниковых газов, уделяется особое внимание. Сток углерода в леса России в начале 1990-х гг. возрос на 100—150 Мм С/год в связи с резким сокращением объема лесозаготовок, и как следствие это выразилось в снижении глобальной концентрации углекислого газа на 1,1 ppm. Из углеродных пулов главным поглотителем углерода является фитомасса (71,8%); на долю мертвой древесины, подстилки и почвы приходится 7,2; 3,6 и 17,4% соответственно [1—2].

Сток углерода определяется способностью фитоценозов поглощать CO₂ в процессе фотосинтеза. При этом углекислый газ атмосферы преобразуется в органическое вещество.

Суммарную величину образовавшегося при фотосинтезе органического вещества называют валовой первичной продукцией (GPP). Часть этого вещества разлагается при метаболизме самих растений, при этом углекислый газ высвобождается в атмосферу. Этот поток именуется дыханием автотрофов (Ra) и варьирует в пределах 40—70% от GPP. Разность между GPP и Ra характеризует количество органического веществ-

ва, пополняющего пул фитомассы, и называется чистой первичной продукцией (NPP).

Цель наших исследований состояла в исследовании сезонной динамики максимальной интенсивности фотосинтеза ели европейской (*Picea abies* L.) в лесных сообществах экспериментального полигона “Лог Таежный”.

Материалы и методы

Исследования проводили в теплый сезон 2010—2012 гг., с мая по сентябрь, на экспериментальном полигоне “Лог Таежный” Валдайского филиала Государственного гидрологического института (ВФ ГГИ). Экспериментальный полигон характеризуется мелкохолмистым рельефом. Относительное превышение холмов над заболоченными понижениями составляет 6—8 м. Древостой представлен ельником-кисличником, также на возвышенных участках встречаются сосняки орляково-кисличные, а на заболоченных участках — сосняки сфагновые.

Измерения проводили на постоянной пробной площади (ПП № 1), заложенной в перестойном (110—120 лет) мелкотравно-зеленомошном ельнике. Средний диаметр древостоя — 37 см, средняя высота — 31 м, бонитет — 1. Ярус подроста и подлеска имеет сомкнутость 0,3; доминирующие позиции в ярусе занимают ель и рябина, участие других видов (береза пушистая и повислая, крушина ломкая, ива козья) незначительно. Проективное покрытие травяно-кустарничкового яруса составляет 60%. В ярусе доминируют бореальные виды: вейник тростни-

ковидный, майник двулистный и кислица. Характерной особенностью травяного покрова является сочетание бореальных (черника, брусника, ожика волосистая, седмичник европейский) и неморальных (зеленчук желтый, сныть, звездчатка жестколистная и др.) видов. В моховом ярусе, проективное покрытие которого достигает 70%, доминируют зеленые мхи (*Pleurozium schreberi*, *Hylocomium splendens*).

Из-за сложности разделения фотосинтетического и дыхательного газообмена на свету мы не измеряли величину истинного фотосинтеза. Интенсивность видимого (нетто-) фотосинтеза определяли газометрическим методом, модифицированным применительно к объекту исследования (метод закрытых камер).

Комплект оборудования, использованный при полевых измерениях, включал: 1) портативный инфракрасный газоанализатор CO_2 , смонтированный на биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова на базе инфракрасного сенсора AZ 7752 с разрешающей способностью 1 ppm (AZ Instrument Corp., Тайвань), и помпу E 134-11-120 (Hargraves Technologies Corp., США); 2) камеру из прозрачного пластика объемом 5100 см³ (34 × 10 × 15 см), снабженную воздухопроводными полиуретановыми трубками и вентилятором; 3) крышку для создания герметизации камеры; 4) термометр Chektemp1. Собственно прибор и корпус камеры образовывали замкнутую систему.

Объектами изучения углекислотного газообмена служили интактные побеги модельных деревьев. При выборе объекта исследования мы основывались на том, что охвоенный побег может служить моделью фотосинтезирующей кроны и отражать физиологическое состояние дерева [3]. Для измерения интенсивности фотосинтеза и темнового дыхания камеру располагали на побегах нижней части крон деревьев. Исследования проводили в третьей декаде каждого месяца, в полуденные часы.

Последовательность измерений выглядела следующим образом. Газоанализатором измеряли концентрацию CO_2 в окружающей среде (атмосфере) — 380—400 ppm. Затем газоанализатор подсоединяли к прозрачной камере (с расположенным в ней побегом ели) с помощью полиуретановых трубок. При этом одна из трубок оставалась открытой для прокачивания атмосферного воздуха через систему. Для этого включали помпу. Когда концентрация углекислого газа в камере становилась примерно равной концентрации CO_2 атмосферы (через 20—30 с), подсоединяли вторую трубку и записывали начальное значение концентрации CO_2 . Значения считывали визуально с дисплея прибора, отмечая секундомером точное время достижения каждого следующего уровня концентрации CO_2 с шагом 10—15 с. Последнее по сравнению с предыдущим резкое изменение концентрации CO_2 считалось конечным значением цикла измерений. Помпа продолжала прокачивать воздух через замкнутую систему в течение всего цикла

измерения. Для измерения темнового дыхания камеру затемняли с помощью чехла из светонепроницаемой ткани. Длительность экспозиции (измерения) на каждом побеге составляла 30—60 с. Интенсивность фотосинтеза и темнового дыхания рассчитывали по уравнению Клайперона—Менделеева, используя значения объема камеры, температуры и давления воздуха. Дополнительно при каждом измерении определяли температуру окружающего воздуха и освещенность. Показатели интенсивности фотосинтеза и темнового дыхания приведены в мг CO_2 /г сухой массы хвои, так как расчет на сухую массу позволяет сравнивать величины ассимиляции и эмиссии CO_2 , характеризующие эффективность воспроизводства и разложения растениями органического вещества, что весьма важно для характеристики продуктивности фитоценозов. Сухую массу хвои определяли путем высушивания в термостате при 105 °С в течение 8 ч. Масса считалась постоянной, если расхождение в массе образцов двух последовательных взвешиваний не превышало 0,1%. Сезонную фотосинтетическую продуктивность определяли как сумму максимальных значений интенсивности нетто-фотосинтеза за все месяцы сезона.

Результаты и обсуждение

Сезонная динамика максимальной интенсивности фотосинтеза ели европейской отражала воздействие комплекса внешних факторов и представляла собой данные, необходимые для оценки фотосинтеза древостоя ели.

Как видно на рис. 1, минимальные значения сезонного максимума интенсивности нетто-фотосинтеза у ели наблюдались в мае, максимальные — в июле. Интенсивность фотосинтеза в июле увеличилась по сравнению с маем на 56% и составила 173,0 мг CO_2 /г сухой массы × день. В дальнейшем наблюдалось снижение показателя фотосинтеза: в августе интенсивность ассимиляции CO_2 уменьшилась по сравнению с июлем на 27% и составила 127,0 мг CO_2 /г сухой мас-

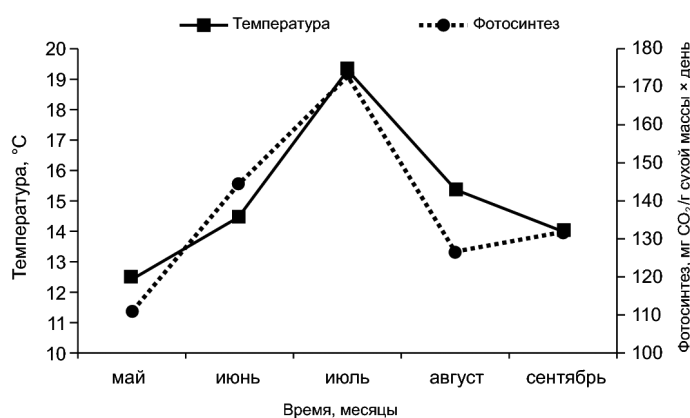


Рис. 1. Сезонная динамика максимальных значений интенсивности фотосинтеза в ельнике-кисличнике экспериментального полигона "Лог Таежный" за теплый сезон 2010—2012 гг.

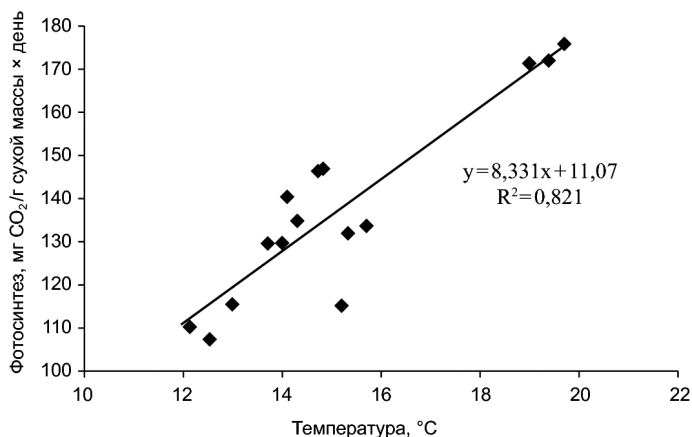


Рис. 2. Зависимость интенсивности ассимиляции CO₂ хвои ели от температуры воздуха

сы × день. При этом интенсивность фотосинтетического газообмена изменялась в зависимости от температуры воздуха.

В работе был выполнен корреляционный анализ связи интенсивности фотосинтетического газообмена хвои с температурой воздуха (рис. 2).

Уравнение регрессии за период наблюдений имеет вид $Y = 8,331X + 11,070$.

Значение коэффициента (8,331), связанного с температурой воздуха, свидетельствует о наличии прямой связи между сезонной фотосинтетической способностью хвои и изменением температурного режима. Линейный коэффициент корреляции (r) составил 0,906, т.е. связь между показателями была высокой. Расчеты показали, что долевым вклад температуры воздуха в процесс фотосинтеза в общем воздействии всех факторов внешней среды составил около 40%; следовательно, на долю других факторов приходилось 60%.

Линейный характер зависимости скорости дневного поглощения CO₂ от солнечной радиации и температуры, а также практическое ее отсутствие от влажности воздуха и содержания CO₂ в воздухе для коренных еловых лесов севера ранее был установлен и другими авторами [4]. Низкие значения линейных коэффициентов корреляции, полученные К.С. Бобковой и Э.П. Галенко, по-видимому, обусловлены более суровыми климатическими условиями в северной тайге по сравнению с южнотаяжской подзоной.

Согласно данным А.С. Щербатюка и др. [5], зависимость фотосинтеза ели от температуры в течение вегетации имеет двухвершинный характер: отмечаются два пика, приуроченные к периодам невысокой температуры воздуха и оптимального почвенного увлажнения — в мае (поздняя весна) и июле (период дождей). Максимальная интенсивность фотосинтеза зарегистрирована в мае при температуре 10 °C, при этом все температуры выше этого значения вызвали резкое снижение фотосинтеза, обусловленное, по мнению авторов, адаптацией фотосинтетического аппарата в этот период вегетации к низкой темпе-

ратуре воздуха. В отличие от отмеченной коллегами внутрисезонной депрессии фотосинтеза в июне нами подобного явления для ели не выявлено. Одновершинный характер сезонной динамики максимальных значений интенсивности фотосинтеза в ельнике-кисличнике экспериментального полигона “Лог Таежный” свидетельствует об отсутствии перегрева фотосинтетического аппарата древостоя в период исследований.

Вероятно, снижение фотосинтетической способности хвои после максимума, наблюдавшегося в середине сезона, связано не с потерей хвои, а со снижением ассимиляционной активности фотосинтетического аппарата у существовавшей хвои, обусловленным изменением температурного режима. Средняя температура воздуха в августе и сентябре снизилась и составила 15,4° и 14° соответственно, против 19,4° в июле. Ранее нами было установлено, что для проявления максимальной активности ключевых ферментов углеродного метаболизма (рибулозобисфосфат-карбоксилазы и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы) диапазон оптимальных температур составляет 20–25° [6]. Сезонный максимум нетто-фотосинтеза в наших исследованиях у ели наблюдался в июле при температуре около 20 °C; в августе и сентябре с понижением оптимума температуры отмечено уменьшение уровня интенсивности ассимиляции CO₂. Аналогичные данные получены и другими авторами [7]. Суммарная величина максимальной интенсивности нетто-фотосинтеза за весь сезон составила 687,1 мг CO₂/г сухой массы × день. Следует отметить, что уровень темнового дыхания не претерпевает заметных изменений, исключение составляет незначительное увеличение дыхательного газообмена в июле и августе (рис. 3). Суммарная величина темнового газообмена хвои за весь сезон составила 191,6 мг CO₂/г сухой массы × день (27,9% от суммарного нетто-фотосинтеза), что свидетельствует о положительном фотосинтетическом углекислотном газообмене хвои древостоя старовозрастных ельников. Согласно данным литературы [6], доля дыхания у древесных растений в среднем за сезон в зоне хвойных смешанных лесов составляет 20–30% истинного фотосинтеза [8].

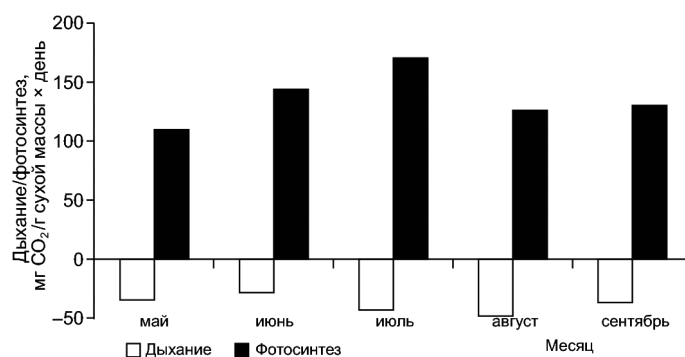


Рис. 3. Внутрисезонные показатели фотосинтеза и темнового дыхания хвои ели

Таким образом, положительный фотосинтетический баланс углерода хвои позволяет заключить, что древостой старовозрастных ельников в лесных экосистемах экспериментального полигона “Лог Таяжский” является резервуаром для стока углерода.

* * *

Работа выполнена в рамках плана научно-исследовательских работ Росгидромета и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-05-00328).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Замолодчиков Д.Г. Системы оценки и прогноза запасов углерода в лесных экосистемах // Устойчивое лесопользование. 2011. Т. 29. № 4. С. 15—22.
2. Замолодчиков Д.Г. Углеродный бюджет лесов России как фактор глобальной динамики парниковых газов атмосферы // Глобальное экологическое процветание / Отв. ред. В.В. Снакин. М.: Academia, 2012. С. 39—45.
3. Михайлова Т.А., Бережная Н.С., Русакова Л.В. и др. Показатели состояния пигментного комплекса сосны обыкновенной, угнетенной аэропромвыбросами // Сиб. экол. журн. 2000. № 6. С. 693—697.
4. Коренные еловые леса Севера: биоразнообразие, структура, функции / Под ред. К.С. Бобковой, Э.П. Галенко. СПб.: Наука, 2006. 337 с.
5. Щербатюк А.С., Русакова Л.В., Суворова Г.Г., Янькова Л.С. Углекислотный газообмен хвойных Предбайкалья. Новосибирск: Наука. Сиб. отд., 1991. 135 с.
6. Юзбеков А.К., Магомедов И.М. Влияние температуры на синтез карбоксилирующих ферментов в этиолированных листьях растений с C₃- и C₄- путем фотосинтеза на свету // Фотосинтез, дыхание и обмен органических кислот. Воронеж, 1980. С. 37—42.
7. Суворова Г.Г., Янькова Л.С., Копытова Л.Д., Филиппова А.К. Максимальная интенсивность фотосинтеза сосны обыкновенной и ели сибирской в Предбайкалье // Сиб. экол. журн. 2005. № 1. С. 97—108.
8. Иванов Л.А., Гулидов И.В., Цельникер Ю.Л. и др. Фотосинтез и транспирация древесных пород в разных климатических зонах. Водный режим. М.: Наука, 1963. С. 121—126.

Поступила в редакцию
09.09.13

SPRUCE FIR PHOTOSYNTHESIS IN THE FOREST ECOSYSTEMS OF THE TEST AREA “LOG TAYEZHNYI”

A.K. Yuzbekov, D.G. Zamolodchikov, A.I. Ivashchenko

The seasonal dynamics of the maximum intensity of net photosynthesis and dark respiration in the spruce fir (*Picea abies* L.) was investigated. It reflects the impact of a complex of external factors and provides data that are required for monitoring the photosynthesis of the spruce fir stand. It was established that no intraseasonal decrease in photosynthesis occurred in June. A relationship between maximum photosynthesis intensity and air temperature was revealed: the seasonal maximum of the net photosynthesis of the spruce fir was reached in July at a temperature of ca. 20 °C. In August and September, a decrease in temperature optimum was accompanied by a reduction in CO₂ assimilation. A positive photosynthesis carbon dioxide balance indicates that old spruce forests in the forest ecosystems of the test area “Log Tayezhnyi” serve as a carbon sink.

Key words: seasonal dynamics, spruce fir, net photosynthesis, respiration, temperature, forest ecosystems.

Сведения об авторах

Юзбеков Ахмед Кадималиевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры общей экологии биологического факультета МГУ. Тел.: +7-926-733-19-44; e-mail: uak2003@mail.ru

Замолодчиков Дмитрий Геннадьевич — докт. биол. наук, зав. кафедрой общей экологии биологического факультета МГУ. Тел.: +7-916-128-27-51; e-mail: dzamolod@mail.ru

Иващенко Андрей Иванович — мл. науч. сотр. кафедры общей экологии биологического факультета МГУ. Тел.: +7-916-120-45-41; e-mail: carbonflux@mail.ru

УДК 579.100

ИЗУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ АССОЦИАЦИИ БАКТЕРИЙ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ НА ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛАХ РАЗЛИЧНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ

Е.С. Лобакова, С.Г. Васильева, Г.А. Дольникова, П.Б. Кашеева, А.Г. Дедов*

(кафедра биоинженерии; elena.lobakova@rambler.ru)

В настоящее время в мировой практике все большее применение для сбора нефти и нефтепродуктов находят синтетические сорбенты в виде нетканых волокнистых материалов. Системы, объединяющие сорбенты и ассоциации микроорганизмов, способных к окислению углеводородов нефти, позволяют создавать эффективные полифункциональные биогибридные материалы, предназначенные для сбора нефти и нефтепродуктов. Изучение особенностей взаимодействия ассоциаций бактерий-нефтедеструкторов (БНД) и полимерных материалов различной химической природы проводили методом сканирующей электронной микроскопии. Отмечена особенность прикрепления, а также специфичность клеточной морфологии бактериальных культур в зависимости от химического типа матрицы. Для изучения эффективности взаимодействия полимерных волокнистых нетканых материалов с БНД было проведено исследование динамики их адсорбции на поверхности различных матриц.

Ключевые слова: нетканые полимерные материалы, нефть и нефтепродукты, бактерии, иммобилизация, деструкция.

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами занимает одно из первых мест по масштабу техногенных катастроф. В воды Мирового океана при аварийных разливах, происходящих на этапах добычи, транспортировки и переработки нефти, по разным оценкам, ежегодно попадает до 15—30 млн т нефти и нефтепродуктов, что крайне отрицательно сказывается на состоянии окружающей среды [1, 2].

Способность к деградации различных углеводородов (УВ) в почвах обнаружена у представителей более 20 родов бактерий, 19 родов дрожжей и 24 родов микроскопических мицелиальных грибов. Среди бактерий наиболее широко распространены в почвах *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* [3, 4].

Нефтяные загрязнения почвы и водных ресурсов разлагаются аэробными микроорганизмами в результате функционирования внутриклеточных оксидаз, участвующих в окислении CH_3 -, CH_2 - и CH -групп УВ. Основной вклад в процессы биохимического разрушения нефти вносят микроорганизмы, способные использовать УВ в качестве единственного источника углерода и энергии [5].

Наиболее важным в настоящее время является очищение природной среды от загрязнений при помощи иммобилизованных микроорганизмов. В связи с этим наиболее оправданным является поиск и селекция природных ассоциаций микроорганизмов-нефтедеструкторов из мест с высокой концентрацией

УВ и их последующая иммобилизация на полимерных матрицах различной химической природы.

Материалы и методы

Синтез полимерных матриц. Были синтезированы матрицы на основе полимерных волокнистых нетканых материалов (ПВНМ) различной химической природы (полипропилен, полиэфир, сополимер акрилонитрила с метилметакрилатом) (табл. 1). Синтез материалов на основе различных полимеров проводился фильерным способом: исходное сырье (в виде гранул) расплавляли или растворяли в плавильном/растворном устройстве, расплав/раствор полимера фильтровали для удаления примесей и продавливали через фильерный комплект с формированием волокон [6]. Синтезированные ПВНМ использовали в качестве матриц для иммобилизации бактерий при создании биогибридных материалов.

В качестве бактериального компонента биогибридного материала была выбрана двухкомпонентная ассоциация бактерий-нефтедеструкторов (БНД), состоящая из представителей рода *Rhodococcus* и *Leu-cobacter*, выделенная из почвы грозненского месторождения нефти (Чеченская республика).

Изучение динамики адсорбции БНД на полимерных матрицах. Для изучения динамики адсорбции использовали покоящиеся клетки ассоциации, предварительно выращенные в питательной среде Эван-

* Кафедра общей и неорганической химии РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина.

Таблица 1

Характеристика полимерных волокнистых нетканых материалов (ПВНМ)

Образец	Химический состав	Поверхностная плотность, г/м ²	Характер поверхности волокон	Плавучесть в течение суток
ПВНМ-1	Полипропилен (ПП)	192	гладкий	высокая
ПВНМ-2	Полиэфир (ПЭ)	134	гладкий, с редкими бугорками	средняя
ПВНМ-3	Сополимер акрилонитрила-метилметакрилата (СПАН)	102	наноструктурированная поверхность	низкая

са и затем ресуспендированные в натрий-фосфатном буфере.

Выращенную на твердой питательной среде Эванса ассоциацию БНД петлей переносили в колбу с жидкой средой аналогичного состава и культивировали в течение 3 сут. Для удаления остаточного субстрата клеточную суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин и два раза отмывали буфером. Отмытые от питательной среды клетки ресуспендировали в натрий-фосфатном буфере до концентрации $0,5 \times 10^8$, $1,0 \times 10^8$ или $2,0 \times 10^8$ клеток/мл. В каждую колбу объемом 100 мл помещали матрицы ПВНМ-1, ПВНМ-2, ПВНМ-3 размером 4×4 см и добавляли по 50 мл полученной суспензии клеток в натрий-фосфатном буфере. Иммобилизацию проводили на орбитальном шейкере (120 об/мин) при температуре 24 °С. Контролем служила суспензия ассоциации без добавления полимерной матрицы. Часть бактериальных клеток ассоциации иммобилизуется на поверхности полимерных волокон, что приводит к падению оптической плотности суспензии. Измерение оптической плотности проводили в динамике на концентрационном фотоэлектрическом колориметре при длине волны 540 нм через 15 мин, 30 мин, 1 ч, 3, 12, 24, 48, 72 ч. Эксперимент проводился в трех повторностях.

Адсорбционную емкость определяли по формулам

$$A = (A_0 - A_t) - 100\%/A_0, \quad [7]$$

где A — адсорбционная емкость, %; A_0 — оптическая плотность клеток в суспензии до иммобилизации, отн. ед.; A_t — оптическая плотность клеток в суспензии при иммобилизации в течение времени t , отн. ед.

$$C = (C_0 - C_t) - V/m, \quad [8]$$

где C — адсорбционная емкость носителя, сух. вес клеток, г/г матрицы; C_0 — концентрация клеток в суспензии до иммобилизации, сух. вес клеток, г/мл; C_t — концентрация клеток в суспензии в процессе иммобилизации в течение времени t , сух. вес клеток, г/мл; V — объем суспензии, мл; m — масса носителя, г.

Изучение особенностей иммобилизации БНД на полимерных матрицах методом сканирующей электронной микроскопии. Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) образцы полученных биогибридных

материалов фиксировали 2%-м раствором глутарового альдегида на 0,1 М какодилатном буфере pH 7,2 в течение 1,5 ч, обезвоживали в серии растворов этанола возрастающей концентрации, из 100%-го этанола переносили в 100%-й ацетон, затем высушивали при критической точке на установке “Dryer НСР-2” (Hitachi, Япония), напыляли золотом с палладием на ионно-напылительной установке “IB-3 Ion Coater” (Eiko, Япония) и исследовали с помощью микроскопа JSM-6380LA (JEOL, Япония).

Результаты и обсуждение

Изучение динамики адсорбции и десорбции бактериальных нефтеструктур на полимерных матрицах. Изучение динамики адсорбции в течение 15 мин, 30 мин, 1 ч и 3 ч (рис. 1, А) с момента погружения полимерных матриц различной химической природы (полипропилен, полиэфир, сополимер акрилонитрил-метилметакрилат (СПАН)) в суспензию клеток ассоциации показало, что для матрицы ПВНМ-2, изготовленной из полиэфира уже в течение первых 15 мин, наблюдается резкое снижение оптической плотности суспензии, что говорит о прикреплении значительного количества бактериальных клеток по сравнению с матрицами на основе полипропилена (ПВНМ-1) и сополимера акрилонитрила и метилметакрилата (ПВНМ-3).

Адсорбционная емкость ПВНМ-2 уже в течение 3 ч составила в среднем 22%, а для ПВНМ-1 и ПВНМ-3 только 2 и 5% соответственно.

Адсорбция клеток на поверхности полимерных матриц различной химической природы при иммобилизации в течение 24, 48, 72 ч была также наибольшей для ПВНМ-2 (рис. 1, Б). Количество иммобилизованных на ПВНМ-2 в течение 72 ч клеток было незначительно больше количества клеток, адсорбированных в течение 48 ч, что говорит о замедлении процесса. Как видно из рис. 1, Б, адсорбционная емкость ПВНМ-1 при иммобилизации в течение 48 ч составила приблизительно 27%, для ПВНМ-3 — 35%. Время иммобилизации в течение 48 ч можно считать оптимальным для всех матриц, так как при увеличении времени иммобилизации до 72 ч адсорбционная емкость ПВНМ-1 и ПВНМ-3 практически не изменяется, а для ПВНМ-2 увеличивается незначительно до 36%.

Адсорбционная емкость матриц

№ матрицы	Масса матрицы, г	Адсорбционная емкость носителя (С), сух. вес клеток, г/г матрицы (время иммобилизации 48 ч)
ПВНМ-1 (полипропилен)	0,188 ± 0,005	0,266 ± 33
ПВНМ-2 (полиэфир)	0,192 ± 0,007	0,876 ± 54
ПВНМ-3 (СПАН)	0,517 ± 0,018	0,102 ± 15

Для изучения динамики адсорбции были выбраны матрицы одинакового размера, однако изученные адсорбенты обладают различными техническими характеристиками (толщина, диаметр волокон, поверхностная плотность и т.д.). В табл. 2 представлены данные адсорбционной емкости носителей, определенных как отношение массы сухого веса адсорбированных

Таблица 2

клеток бактерий на 1 г матрицы; лучше всего заселяется микроорганизмами матрица на основе полиэфира.

Изучение динамики десорбции с поверхности матриц показало, что бактерии, входящие в состав исследованной ассоциации, более прочно прикреплялись к поверхности образцов ПВНМ-1 и ПВНМ-3. Изучение динамики адсорбции и десорбции БНД показало, что культура лучше всего адсорбируется на поверхности ПВНМ-2, но также легко десорбируется с поверхности этой матрицы, что говорит о слабом прикреплении клеток к поверхности полиэфирных волокон.

Исследование процесса иммобилизации БНД на полимерных материалах с помощью метода сканирующей электронной микроскопии. Исследование процессов адсорбции бактериальных культур на матрицах

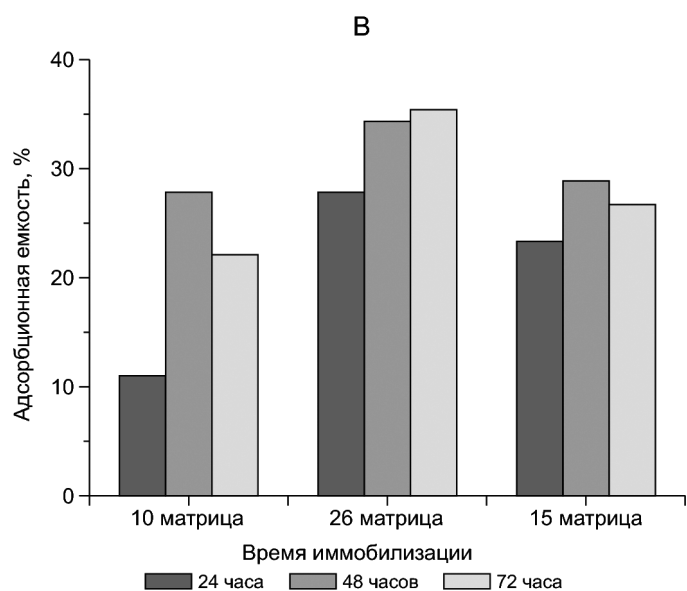
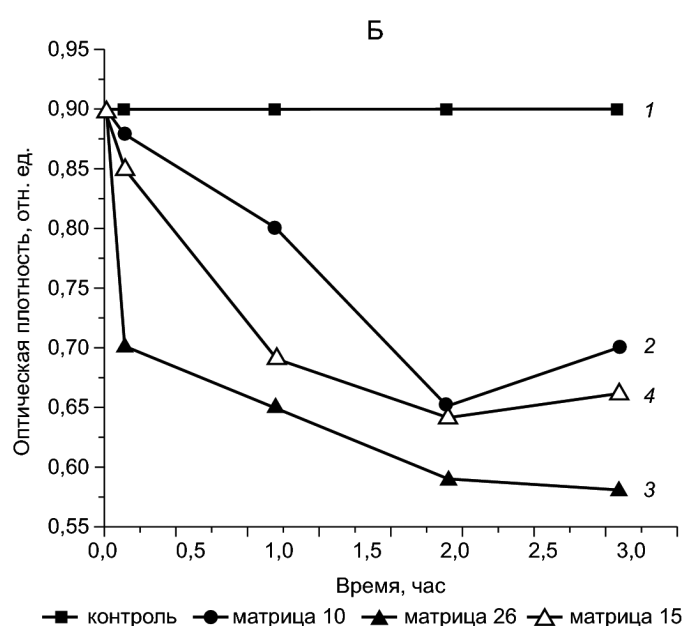
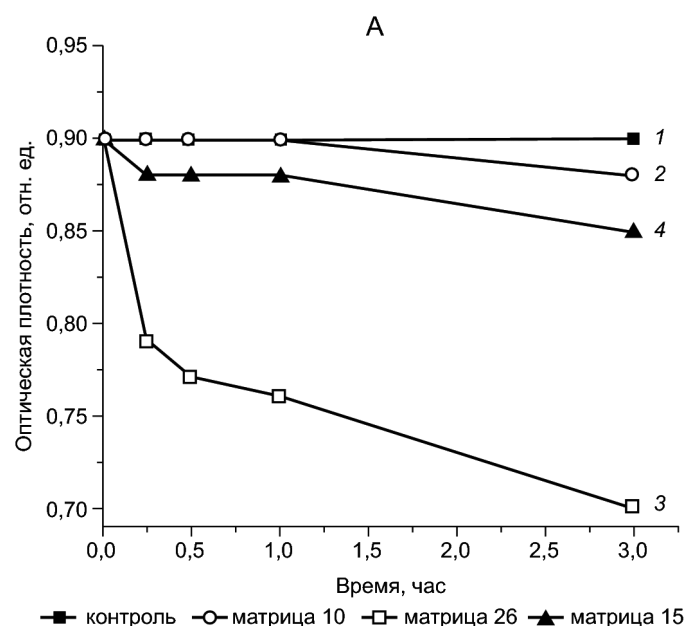


Рис. 1. Динамика адсорбции клеток модифицированной ассоциации БНД на поверхности полимерных матриц различной химической природы и адсорбционная емкость полимерных матриц. А — динамика адсорбции клеток: 15 мин, 30 мин, 1 ч и 3 ч. 1 — суспензия клеток родококков без матрицы; 2 — матрица № 10 (ПВНМ-1); 3 — матрица № 26 (ПВНМ-2); 4 — матрица № 15 (ПВНМ-3). Б — динамика адсорбции клеток: 24 ч, 48 ч, 72 ч. (обозначения те же, что на рис. 1, А). В — адсорбционная емкость полимерных матриц

различной природы (полиэфир, полипропилен, акрилонитрил-метилметакрилат) и определение морфофункционального состояния бактерий-нефтедеструкторов проводили с помощью сканирующей электронной микроскопии (JEOL). Характер взаимодействия культур и полимерных матриц при создании биогибридных материалов оценивали на основании следующих признаков: особенности локализации бактерий-нефтедеструкторов на волокнах полимерных матриц, особенности морфологии и цикла развития бактериальной культуры. На всех типах выбранных полимерных матриц нами обнаружено закрепление бактериальных клеток. Однако характер прикрепления клеток к волокнам матриц различной природы отличается, также обнаружена специфичность морфологии БНД.

Матрицы различной химической природы (полипропилен, полиэфир, акрилонитрил-метилметакрилат) имеют различный набор функциональных групп и разные технические характеристики (толщина волокон и плотность упаковки волокон в полотне, характер поверхности волокон).

ПВНМ-1 представляет собой полимерный нетканый материал из полипропилена (рис. 2). Диаметр волокон матрицы варьирует от 5 до 15 мкм. Поверхность волокна гладкая. В поверхностном слое матрицы бактериальные клетки располагаются в зоне пересечения волокон (рис. 2, А). Наблюдаются как одиночно располагающиеся бактериальные клетки, так и разных размеров конгломераты клеток (рис. 2, Б). Морфология клеток однотипная: палочки 0,5 мкм и длиной 0,5—1,2 мкм. Бактерии погружены в толщу полимерного матрикса и плотно прилегают к поверхности полимерного волокна. Во внутреннем слое матрицы наблюдается равномерное распределение бактериальных клеток на поверхности волокон и образование небольших конгломератов (рис. 2, В). Морфотип клеток для поверхностного и внутреннего слоя матрицы сходен.

На ПВНМ-2 расположены одиночные бактериальные клетки и небольшие кластеры, погруженные в биополимерный матрикс. Выявляется частичная интрузия (внедрение) клеток бактерий в волокна матрицы на основе полиэфира (рис. 3, А). На рис. 3, Б

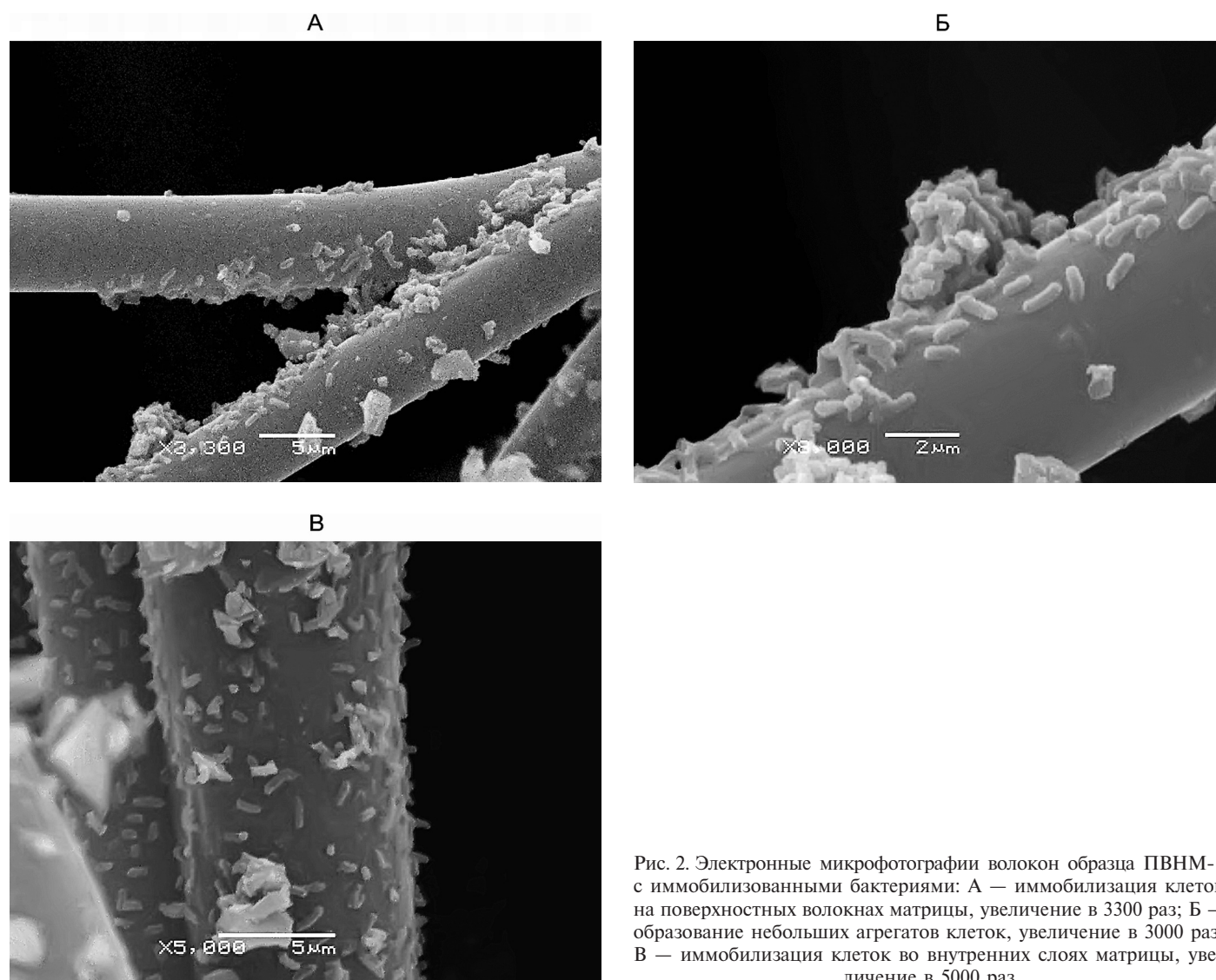


Рис. 2. Электронные микрофотографии волокон образца ПВНМ-1 с иммобилизованными бактериями: А — иммобилизация клеток на поверхностных волокнах матрицы, увеличение в 3300 раз; Б — образование небольших агрегатов клеток, увеличение в 3000 раз; В — иммобилизация клеток во внутренних слоях матрицы, увеличение в 5000 раз

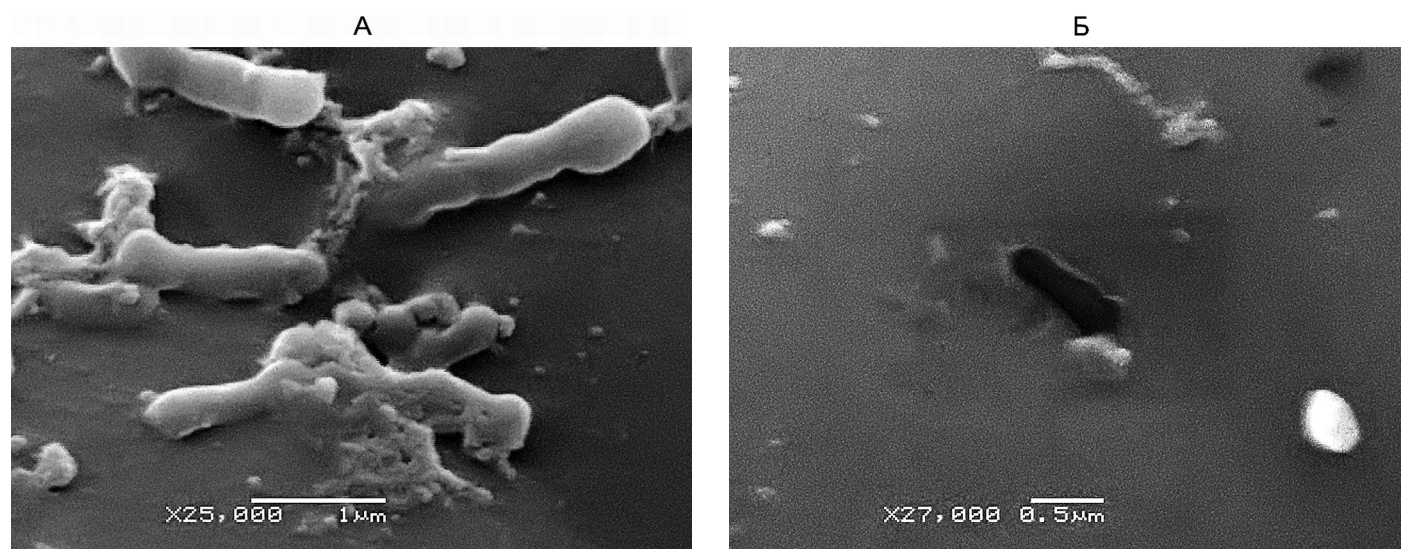


Рис. 3. Электронные микрофотографии волокон образца ПВНМ-2 с иммобилизованными бактериями: А — интрузия клеток в волокно матрицы; Б — место открепившейся с поверхности волокна бактерии в виде палочки

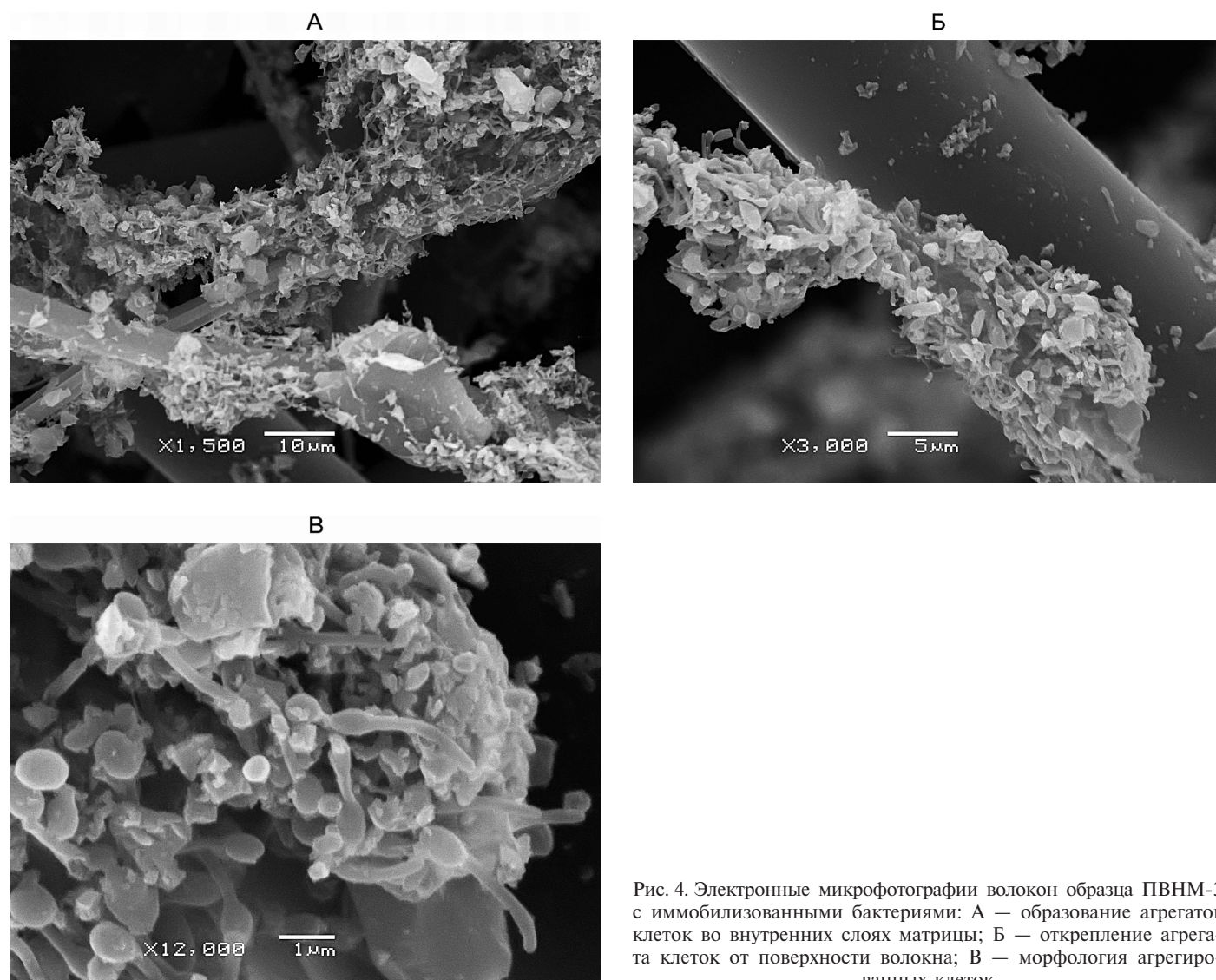


Рис. 4. Электронные микрофотографии волокон образца ПВНМ-3 с иммобилизованными бактериями: А — образование агрегатов клеток во внутренних слоях матрицы; Б — открепление агрегата клеток от поверхности волокна; В — морфология агрегированных клеток

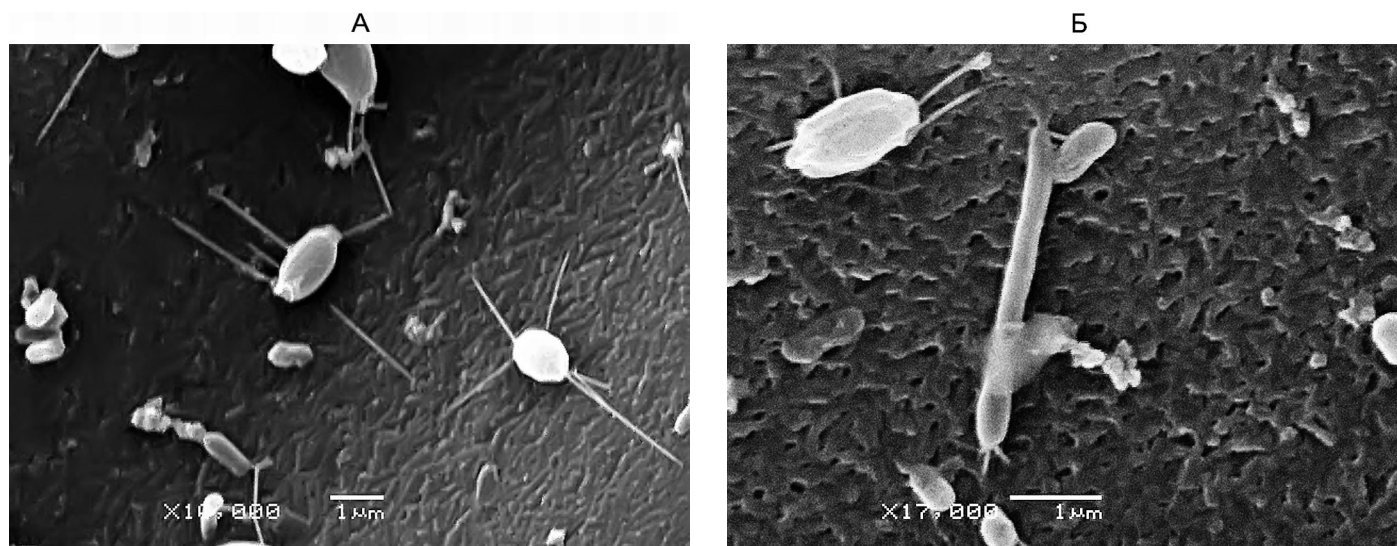


Рис. 5. Прикрепление бактериальных клеток к поверхности ПВНМ-3: А — прикрепление клеток с формой палочки; Б — прикрепление клеток веретеноподобной формы

показано место открепившейся с поверхности волокна бактериальной культуры.

Морфология клеток однотипная: палочки 0,5 мкм и длиной 0,5—1,2 мкм. На внешней поверхности матрицы количество бактериальных клеток меньше, чем во внутренних слоях. Это может быть связано с тем, что в БНД легко открепляются с поверхности матрицы.

Диаметр волокон ПВНМ-3 варьирует от 3 до 60 мкм, имеются волокна с гладкой поверхностью и волокна с глубокими продольными ложбинками. Клетки бактерий распределены на поверхностных волокнах матрицы равномерно. При иммобилизации в течение 2 сут распределение клеток на волокнах матрицы равномерно, встречаются как одиночные клетки, так и небольшие агрегаты. При увеличении времени культивирования до 5 сут во внутренних слоях матрицы наблюдается утолщение волокон за счет образования крупных агрегатов бактериальных клеток (рис. 4, А). Агрегаты клеток заполняют просветы между волокнами матрицы и могут неплотно прилегать к поверхности волокна. Крупные агрегаты могут открепляться с поверхности полимерного волокна (рис. 4, Б). Такие агрегаты образованы бактериальными клетками следующих морфотипов: палочки толщиной 0,5 мкм и длиной 2,0—4,0 мкм с утолщением на конце, мелкие кокки $0,3 \times 0,3$ мкм, $0,5 \times 0,5$ мкм, крупные кокки $1,0 \times 1,0$ мкм. Процесс прикрепления бактериальных клеток к поверхности матрицы сопровождается выделением слизистого матрикса сетчато-губчатой структуры.

Бактерии рода *Rhodococcus* являются основным компонентом изученной ассоциации. Известно, что они имеют мощную липофильную стенку, обладающую высоким сродством к гидрофобному субстрату [9].

Считается, что потенциальными факторами адгезии родококков являются гидрофобная клеточная

стенка, поверхностные выросты и экзополисахариды [10]. Из данных по ультраструктуре и морфологии клеток родококков известно, что в адгезии и кооперации их клеток друг с другом, формировании колоний участвуют пептидогликановые слои клеточной стенки, а также пилевидные поверхностные тяжи и множественные шишковидные и шиповидные выросты клеточной поверхности [9, 11]. ПВНМ-3 имеет неровную поверхность, значительное количество впадин и бугорков, а также характеризуется наличием мелких пор размером 20—70 нм. При иммобилизации на ПВНМ-3 наблюдалось образование клетками пилевидных тяжей, структур, способствующих прочному закреплению БНД на поверхности матриц. Образование пилевидных тяжей наблюдалось как у клеток с веретеноподобной формой (длина тяжей 1—3 мкм) (рис. 5, А), так и у клеток в виде длинных палочек (длина тяжа 0,3 мкм) (рис. 5, Б).

Таким образом, при изучении взаимодействия полимерных материалов различной химической природы и модельной ассоциации бактерий-нефтедеструкторов был показан активный характер прикрепления клеток. Иммобилизация бактерий на полимерных материалах осуществлялась путем интрузии бактериальных клеток в волокна ПВНМ-2, выделения внеклеточного полимерного матрикса на волокнах ПВНМ-1, с образованием пилевидных тяжей и полимерного матрикса на волокнах ПВНМ-3. Были отмечены специфичность морфологии бактериальных клеток ассоциации и присутствие на поверхности волокон активно делящихся бактериальных клеток, приводящих к образованию крупных клеточных кластеров.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (грант № 16.513.12.3028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мерициди И.А. Техника и технология локализации и ликвидации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов. СПб.: НПО "Профессионал", 2008. 824 с.
2. Корженевская Т.Г. Роль микроорганизмов в преобразовании состава нефти и нефтяных биотехнологиях. М.: Геоинформцентр, 2002. 76 с.
3. Арене В.Ж., Гридин О.М. Эффективные сорбенты для ликвидации нефтяных разливов // Экология и промышленность России. 1997. № 2. С. 102—110.
4. Квасников Е.И., Ключникова Т.М. Микроорганизмы — деструкторы нефти в водных бассейнах. Киев: Наукова Думка, 1981. 130 с.
5. Киреева Н.А. Влияние биоремедиации на условно-патогенные микромицеты нефтезагрязненных почв // Проблемы медицинской микологии. 2005. Т. 7. № 2. С. 40—41.
6. Omarova E.O., Lobakova E.S., Dolnikova G.A., Nekrasova V.V., Idiatulov R.K., Kashcheeva P.B., Perevertailo N.G., Dedov A.G. Immobilization of bacteria on polymer matrices for degradation of crude oil and oil products // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 1. P. 24—31.
7. Выдрякова Г.А., Выдрякова Г.А., Кирпиченко Т.В., Лифантьева А.А. Формирование агрегированных структур светящимися бактериями в присутствии углеводов // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2. С. 282—284.
8. Гвоздяк П.И. Имобилизованные микроорганизмы в очистке сточных вод от ксенобиотиков // Имобилизованные клетки в биотехнологии. Пушкино, 1987. С. 56—62.
9. Коронелли Т.В. Липиды миксобактерий и родственных микроорганизмов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. 158 с.
10. Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде (обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. 1996. Т. 32. № 6. С. 579—585.
11. Коронелли Т.В. Углеводородокисляющие микроорганизмы арктических вод и льдов // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1989. № 4. С. 581—587.

Поступила в редакцию
15.05.13

THE INVESTIGATION OF IMMOBILIZATION OF BACTERIA ASSOCIATION ON DIFFERENT POLIMERIC MATERIALS

E.S. Lobakova, S.G. Vasilieva, G.A. Dolnikova, P.B. Kascheeva, A.G. Dedov

Nowadays the synthesized polymeric materials for oil degradation are widely used. The creation of systems which combines these materials with oil-degrading microorganisms gives the possibility to obtain the effective polyfunctional bio-hybrid materials. The investigation of polymeric material and microorganisms interaction was conducted using the scanning electron microscopy. The peculiarities of immobilization and bacteria morphology depending on different types of polymeric materials were investigated. For assessment of immobilization effectiveness the adsorption dynamics was studied.

Key words: *non-woven polymer materials, oil and petroleum products, bacteria, degradation, immobilization.*

Сведения об авторах

Лобакова Елена Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-38-07; e-mail: elena.lobakova@rambler.ru

Васильева Светлана Геннадьевна — науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10.

Дольникова Галина Александровна — науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10.

Кашеева Полина Борисовна — аспирант, РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина. Тел.: 8-499-135-84-36; e-mail: polinab@list.ru

Дедов Алексей Георгиевич — докт. хим. наук, зав. кафедрой, РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина. Тел.: 8-499-135-84-36; e-mail: dedov.a@mail.ru

ЭНТОМОЛОГИЯ

УДК: 595.728: 591.582.2

**ВИБРОАКУСТИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ КУЗНЕЧИКОВ
ПОДСЕМЕЙСТВА CONOCEPHALINAE (ORTHOPTERA, TETTIGONIIDAE)
ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ****А.А. Бенедиктов**

(кафедра энтомологии; e-mail: entomology@yandex.ru)

Впервые зарегистрированы и описаны смешанные виброакустические сигналы ухаживания самца за самкой кузнечиков *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и *C. dorsalis* (Latr.). Осциллограммы приводятся.

Ключевые слова: Orthoptera, Tettigoniidae, Conocephalinae, стридуляция, вибрационные сигналы.

На территории европейской части России обитают два вида кузнечиков подсемейства мечников (Tettigoniidae, Conocephalinae): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.) (рис. 1, 2). Стридуляционные звуковые призывные сигналы самцов обоих видов неоднократно описывались в научной литературе (обзор биоакустических работ для *C. discolor* и *C. dorsalis*: [1]). В то же время сведения о вибрационных сигналах представителей рода

Conocephalus spp. Старого Света до настоящего времени отсутствуют, хотя имеются для видов, обитающих в Северной Америке [2]. Для других кузнечиков показано, что вибрационная реплика звукового сигнала самца, передаваемая через субстрат (растение) даже без воспроизведения звука, играет немаловажную роль в привлечении и ориентации самок [3, 4]. Наши наблюдения за мечниками в природе и лаборатории позволили установить, что во время ухаживания за самкой самцы способны не только стри-



Рис. 1, 2. Внешний вид самцов (слева) и самок (справа) кузнечиков мечника обыкновенного *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (1) и мечника короткокрылого *Conocephalus dorsalis* (Latr.) (2). Фото: А. Бенедиктов

дулировать, издавая высокочастотные звуковые сигналы, но и параллельно продуцировать особые вибрационные сигналы, отличные от таковых, возникающих в субстрате как реплика стридуляции.

Материалы и методы

Звуки и вибрации оцифровывали синхронно на два разных канала мидиск-рекордера Sony Hi-MD Walkman MZ-RH910 (20–20 000 Гц). Звук стридуляции регистрировали через электретный конденсаторный микрофон Creative MC-1000 (100–16 000 Гц), а вибрационные сигналы — при помощи пьезокерамического адаптера ГЗП-308 (50–12 500 Гц), подведенного к картонной пластине 54 × 85 мм, на которой сидели насекомые. Температура во время записи +27–28 °С. Обработку сигналов проводили на компьютере.

При описании осциллограмм использовали традиционную терминологию, предложенную Р.Д. Жантисевым [5].

Сравнение осциллограмм, полученных на нашей аппаратуре, с таковыми — результатом использования специальных широкополосных микрофонов и регистраторов на кафедре энтомологии МГУ для заходящих в ультразвуковую область акустических сигналов *Conocephalus* spp. — показало, что они вполне сопоставимы, а различия в их амплитудно-временной структуре в данном случае не наблюдаются.

Поскольку подробное описание амплитудно-временных и количественных характеристик призывных сигналов этих видов публиковались многократно, то в нашей статье они не приводятся, а сделан акцент только на качественном различии таковых с сигналами ухаживания за самкой в связи с регистрацией вибрационных компонентов.

Результаты и обсуждение

***Conocephalus fuscus* (Fabr.).** Изучено 2 самца из Москвы: Кусковский лесопарк, 15 VIII 2013.

Существенных различий в амплитудно-временной структуре звуковых сигналов одиночного самца и самца

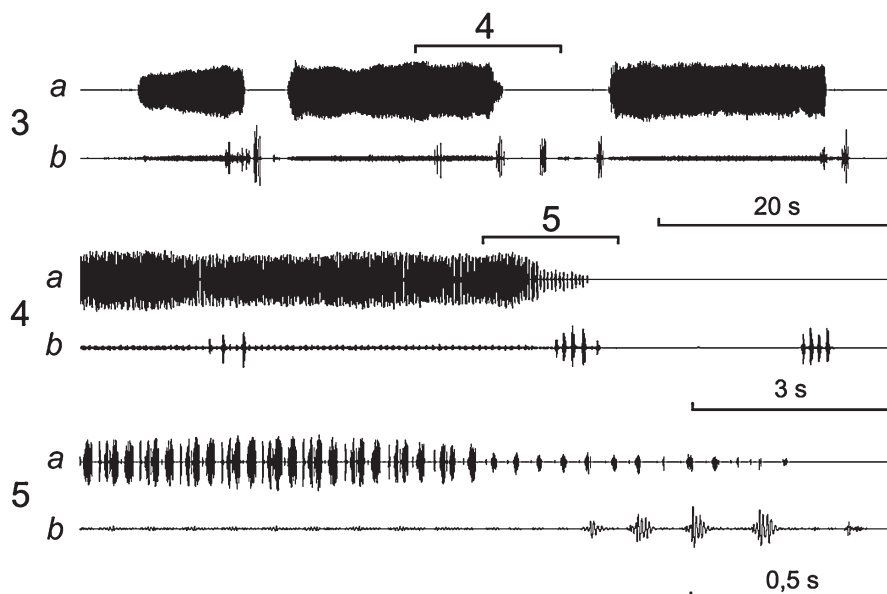


Рис. 3–5. Осциллограммы на разных скоростях развертки звукового (a) и вибрационного (b) сигналов самца *Conocephalus fuscus* (Fabr.) возле самки

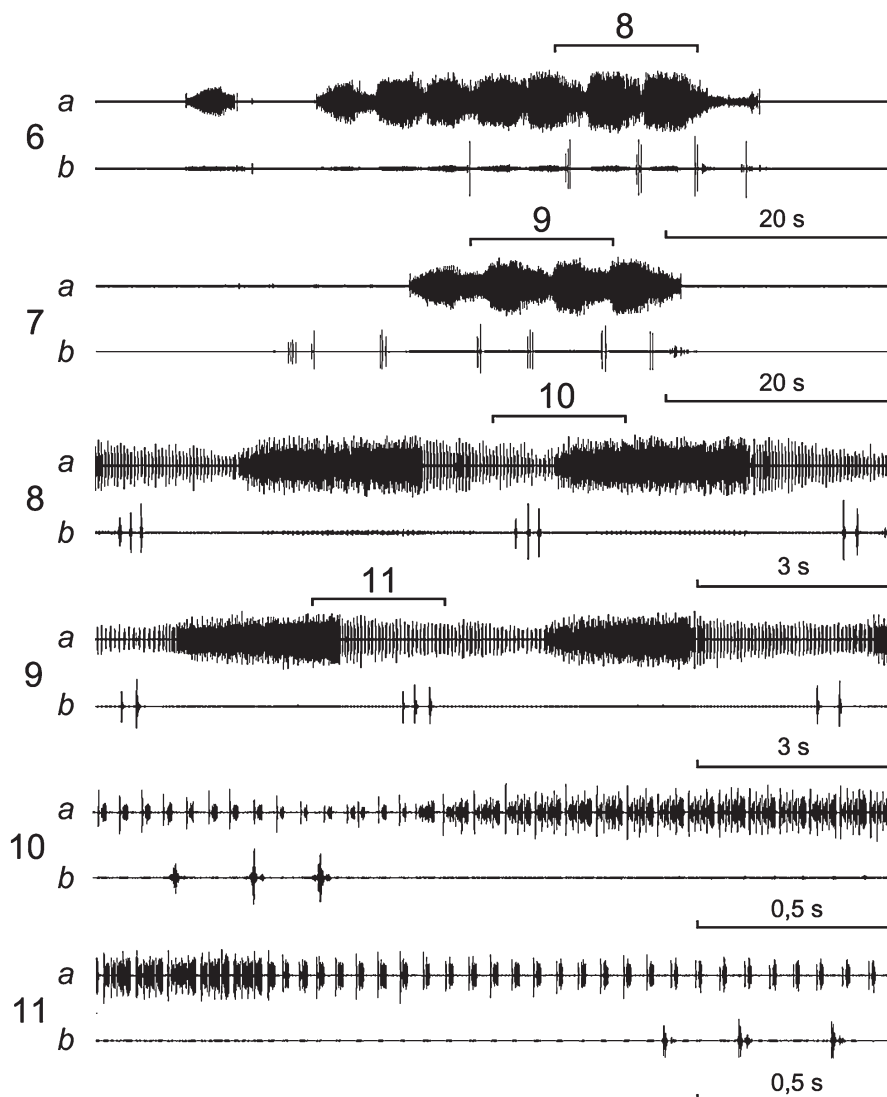


Рис. 6–11. Осциллограммы на разных скоростях развертки звукового (a) и вибрационного (b) сигналов самца *Conocephalus dorsalis* (Latr.) возле самки

возле самки не выявлено. Вместе с тем когда возле самца оказывалась самка, то он начинал издавать комбинированный сигнал ухаживания из звуковых серий, сходных по структуре с призывным сигналом, вставляя в различные его части и паузы серии длительностью 460—712 мс из 3—5 вибрационных пульсов (рис. 3—5). Такие вибрации образовывались за счет резкого вздрагивания самца всем телом, при этом его брюшко субстрата не касалось. Вибрационная реплика звукового сигнала хорошо регистрировалась как низкоамплитудная вибрация. Таким образом, наличие вибрационных компонентов во время звуковой стридуляции отличает сигнал ухаживания от призыва.

***Conocephalus dorsalis* (Latr.).** Изучено 2 самца из Москвы: Теплостановский лесопарк, 8 VIII 2013.

Как и в случае с предыдущим видом, существенных различий в амплитудно-временной структуре звуковых сигналов одиночного самца и самца возле самки не выявлено. Однако когда в поле зрения самца попадала самка, вызывая, кроме того, вибрации субстрата своим передвижением, самец начинал комбинировать звуковой сигнал с одиночными вибрационными пульсами или сериями из 2—4 пульсов длительностью 278—708 мс (рис. 6—11), образованными также за счет резкого вздрагивания всем телом без касания субстрата брюшком. Наблюдения с синхронной регистрацией звукового и вибрационно-

го сигналов показали, что вибрационные пульсы могли издаваться: во-первых, в непосредственной близости от самки при попытках копуляции с ней без стридуляции (рис. 7, начало сигнала), во-вторых, на некотором расстоянии от самки во время стридуляции фрагмента сигнала из дискретных сдвоенных пульсов (рис. 8—11). В момент эмиссии фрагмента сигнала из серий по 4 сдвоенных пульсов вибрационная активность самца не отмечена. Вибрационная реплика звукового сигнала регистрировалась как низкоамплитудная вибрация. Функциональное значение вибрационных компонентов во время звуковой стридуляции у этого вида сходно с предыдущим и отличает его сигнал ухаживания от призыва.

Интересно и то, что посаженные вместе два самца также вначале попеременно издавали сходные беззвучные серии вибрационных сигналов, пытаясь вступить друг с другом в копуляцию. Однако стоило одному из них издать звуковой сигнал, как попытки спаривания прекращались и оба самца быстро разбегались в разные стороны.

Автор благодарен О.С. Корсуновской (кафедра энтомологии биологического факультета МГУ) за запись сигналов самцов *Conocephalus* spp. на регистрирующей ультразвук аппаратуре и предоставление их осциллограмм для сравнения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ragge D.R., Reynolds W.J. The songs of the grasshoppers and crickets of Western Europe. Published by Harley Books in association with The Natural History Museum. L., 1998. 591 p.
2. De Luca P.A., Morris G.K. Courtship communication in meadow katydids: Female preference for large male vibrations // Behaviour. 1998. Vol. 135. P. 777—794.
3. Keuper A., Otto C., Latimer W., Schatral A. Airborne-sound and vibration signals of bushcrickets and locusts; their

importance for the behaviour in the biotope // Acoustic and vibrational communication in insects / Eds K. Kalmring, N. Elsner. Hamburg; Berlin: Paul Parey Verlag, 1985. P. 135—142.

4. Stiedl O., Kalmring K. The importance of song and vibratory signals in the behaviour of the bushcricket *Ephippiger ephippiger* Fiebig (Orthoptera, Tettigoniidae): taxis by females // Oecologia. 1989. N 80. P. 142—144.

5. Жантмиев П.Д. Биоакустика насекомых. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981. 256 с.

Поступила в редакцию
31.08.13

VIBRO-ACOUSTICAL SIGNALS OF THE MEADOW KATYDIDS FROM THE SUBFAMILY CONOCEPHALINAE (ORTHOPTERA, TETTIGONIIDAE) FROM EUROPEAN PART OF RUSSIA

A.A. Benediktov

Courtship vibro-acoustical mixed signals of the male's *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) and *C. dorsalis* (Latr.) are described for the first time. Oscillogramms are presented.

Key words: Orthoptera, Tettigoniidae, Conocephalinae, stridulation, vibrational signals.

Сведения об авторах

Бенедиктов Александр Александрович — мл. науч. сотр. кафедры энтомологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-16-95; e-mail: entomology@yandex.ru

ФАУНА, ФЛОРА

УДК 598.289; 591.1

**СУТОЧНЫЕ РИТМЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА
ПОКОЯ И ДЫХАТЕЛЬНОГО КОЭФФИЦИЕНТА
У МОСКОВОК (*PERIPARUS ATER*, AVES)
В ОСЕННЕ-ЗИМНИЙ ПЕРИОД****В.В. Гаврилов, Г.В. Моргунова***(Звенигородская биологическая станция им. С.Н. Скадовского;
e-mail: vadimgavrilov@yandex.ru)*

Энергетический обмен птиц измеряли проточным респирометром по потреблению O_2 и выделению CO_2 в состоянии покоя в дневное и ночное время, в затемненной камере при постоянной температуре $25^\circ C$ с октября по март 2009—2013 гг. в западном Подмосковье. Энергетический обмен в покое и дыхательный коэффициент у москотов имеют суточные ритмы с минимальным значением в ночные часы (с 2 до 5 ч) и с одним пиком в дневные часы (с 11 до 14 ч). Существует достоверная линейная зависимость, связывающая увеличение энергетического метаболизма покоя с увеличением дыхательного коэффициента. Максимальная разница между значениями энергетического обмена покоя днем и ночью составляет 55%. Можно сделать вывод, что в ночные часы преимущественно окисляются жиры, накопленные во время питания, а днем — белки, извлекаемые из пищи, либо смесь из белков, жиров и углеводов.

Ключевые слова: москотовка, суточные ритмы, энергетический метаболизм, метаболизм покоя, RQ , дыхательный коэффициент.

Энергетическому обмену (ЭО) птиц с XIX в. посвящается довольно большое количество работ. Однако в последнее время появилась точка зрения о необходимости ревизии данных об энергетическом обмене птиц [1—3].

Показано, что разница между дневными и ночными значениями ЭО покоя составляет 25—40% [4] или 20% [5, 6]. Кроме того, был обнаружен суточный ритм ЭО покоя, сохраняющийся при постоянных условиях [6—12]. Были показаны вариации ЭО в зависимости от сезона, образа жизни, использования различных местообитаний и т.д. [13—16], однако величина этих различий, их постоянство в течение суток, наличие повторяющихся суточных ритмов, связь с другими физиологическими и экологическими характеристиками остаются неопределенными.

При окислении разных субстратов выделяется разное количество CO_2 [17]. Отношение количества образовавшегося в процессе метаболизма CO_2 к количеству потребленного O_2 называется дыхательным коэффициентом (ДК), этот показатель играет важную роль в физиологии обмена веществ. Для точной оценки энергетических затрат птиц в разных условиях и при разном питании необходимо одновременно измерять потребление O_2 и выделение CO_2 [18].

Цель данной работы — измерить ЭО покоя и ДК у синиц москотов (*Periparus ater*, Aves), обитающих в Подмосковье в осенне-зимний период, взятых не-

посредственно из природы, у которых завершились осенние линьки, но не наступил весенний брачный период, в термонейтральной зоне при стандартных условиях в разное время суток.

Материалы и методы

Исследования проводили с октября по март 2009—2013 гг. на территории Звенигородской биологической станции им. С.Н. Скадовского биологического факультета МГУ в западном Подмосковье. Свободноживущих птиц отлавливали паутинными сетями или западками и после соответствующих стандартных измерений помещали в камеру газового анализатора, где определяли стандартный ЭО методом непрямой калориметрии. Измеряли потребление O_2 и выделение CO_2 птиц с помощью проточного респирометра FoxBox-C фирмы “Sable Systems Int.” (USA). Одновременно регистрировали скорость потока воздуха через камеру, температуру в камере и концентрацию CO_2 и O_2 . Скорость потребления O_2 и выделения CO_2 определяли методом проточной респирометрии [19]. Уличный воздух в термостате разделялся на 2 равных по величине потока, один из которых поступал в герметичную респираторную камеру с птицей, а другой — в аналогичную пустую (контрольную) камеру. Через камеры непрерывно пропускали воздух независимыми насосами (скорость потока 600—850 мл/мин, объем камер около 2 л). Поглоти-

тели воды не использовались. Скорость потребления O_2 и выделения CO_2 птиц вычислялась на основании измерения разности концентраций этих газов на выходе из респираторной камеры с птицей и на выходе из пустой аналогичной камеры (рассчитывается как разность концентраций, умноженная на скорость протока воздуха через камеры). Концентрацию CO_2 и O_2 после респираторной камеры с птицей и аналогичной пустой камеры измеряли последовательно в одном приборе в течение 24–30 и 6–10 мин соответственно, частота снятия показаний прибором — 1 раз в 10 с. Все объемы газов приводились к стандартным условиям (STPD). Измерения проводили днем (2,5–3,2 ч) и ночью (8–10 ч) в затемненной камере при постоянной температуре 25 °С (в термонейтральной зоне). Время от момента поимки птицы до помещения ее в камеру составляло 20–40 мин, опыты начинали в разное время суток. ДК определяли во время опыта, ЭО птиц рассчитывали непрерывно на основе вычисленных значений ДК в данный момент времени [19]. Для анализа использовали минимальные значения ЭО птицы в опыте, которые обычно регистрировали через 1–1,5 ч после начала эксперимента. Усреднения делали на отрезке не менее 4 мин в программе MatLab (на участке минимальных значений). Аналогичные расчеты проводили для определения ДК. После окончания опыта птицу отпускали. Некоторых птиц отлавливали и измеряли несколько раз. Всего проведено 64 опыта.

Средняя масса тела москотов, использованных в опытах, составила $9,7 \pm 0,6$ г ($n = 32$), приводится как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

Результаты

Данные ЭО, полученные ночью, имеют зависимость от массы тела, тогда как для данных, полученных днем, эта зависимость не была обнаружена. Для ночных значений ЭО покоя (FMR, кДж/сут) показатель степени уравнивания зависимости от массы тела (m , г) близок к единице: $FMR = 2,02m^{0,94}$. Достоверность уравнения невысока ($p > 0,05$, $R^2 = 23\%$). Чтобы в дальнейшем исключить влияние массы тела на ЭО покоя птиц, для всех энергетических данных (кроме особо оговоренных) мы приводим значения удельной интенсивности ЭО (величина ЭО в единицу времени на 1 г массы тела птицы). Влияния массы тела птиц на ДК как в ночных, так и в дневных опытах не обнаружено.

Продолжительность каждой серии экспериментов по оценке ЭО птиц составила более 3 ч, поэтому все время суток мы смогли разбить на восемь трехчасовых интервалов, для которых и были получены соответствующие значения метаболизма покоя и минимального ДК (таблица).

ЭО покоя у москотов имеет ярко выраженный суточный ритм с минимальным значением в ночные

**Энергетический метаболизм покоя
и минимальный дыхательный коэффициент москотов
в разное время суток**

Время суток, час	Число опытов, шт.	Энергетический метаболизм покоя, кДж/сут · г	Дыхательный коэффициент
23:00—2:00	7	$1,8 \pm 0,08$	$0,743 \pm 0,041$
2:00—5:00	8	$1,76 \pm 0,17$	$0,729 \pm 0,05$
5:00—8:00	7	$1,79 \pm 0,09$	$0,753 \pm 0,034$
8:00—11:00	11	$2,7 \pm 0,48$	$0,779 \pm 0,043$
11:00—14:00	8	$3,18 \pm 0,76$	$0,799 \pm 0,04$
14:00—17:00	8	$2,13 \pm 0,29$	$0,751 \pm 0,038$
17:00—20:00	4	$1,88 \pm 0,26$	$0,76 \pm 0,015$
20:00—23:00	11	$1,83 \pm 0,29$	$0,745 \pm 0,037$

часы (с 2 до 5 ч) и с одним пиком в дневные часы (с 11 до 14 ч) (таблица, рис. 1). Несмотря на то что все измерения ЭО покоя москотов были сделаны в темной камере, из рис. 1 видно, что ЭО москотов зависит от светового суточного ритма. Весь день в осенне-зимний период можно условно разделить на: ночь — с 20 до 8 ч; день — с 8 до 17 ч; сумерки — с 17 до 20 ч. ЭО москотов низок весь ночной период, с минимумом примерно в середине ночи — с 2 до 5 ч, днем ЭО резко возрастает, в поздние дневные часы и в сумерки ЭО плавно снижается от дневного уровня к ночному (рис. 1). ЭО москотов в покое достоверно отличается в зависимости от времени измерения ($p < 0,001$, критерий Краскела—Уоллиса: $H(7, N = 64) = 43,96$). Минимальные значения ЭО покоя, полученные с 2 до 5 ч, достоверно отличаются от значений, полученных с 8 до 11, с 11 до 14 и с 14 до 17 ч ($p < 0,01$, U-критерий Манна—Уитни). Максимальные значения ЭО покоя, полученные с 11 до 14 ч, достоверно отличаются от всех значений,

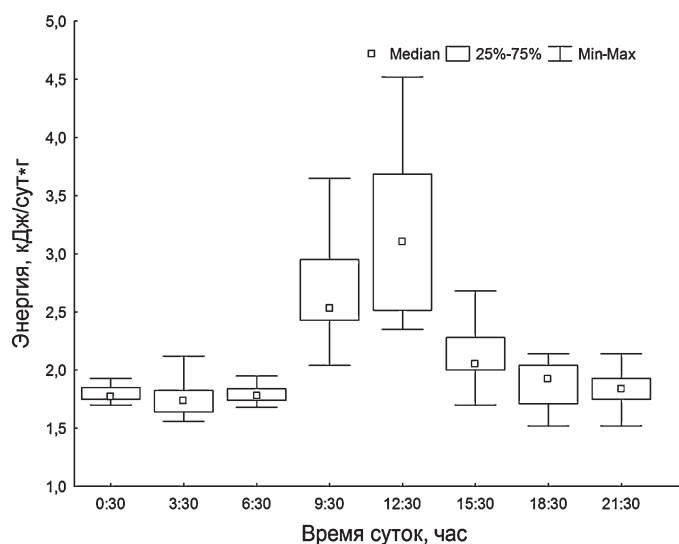


Рис. 1. Суточная динамика энергетического метаболизма покоя синиц москотов в осенне-зимний период

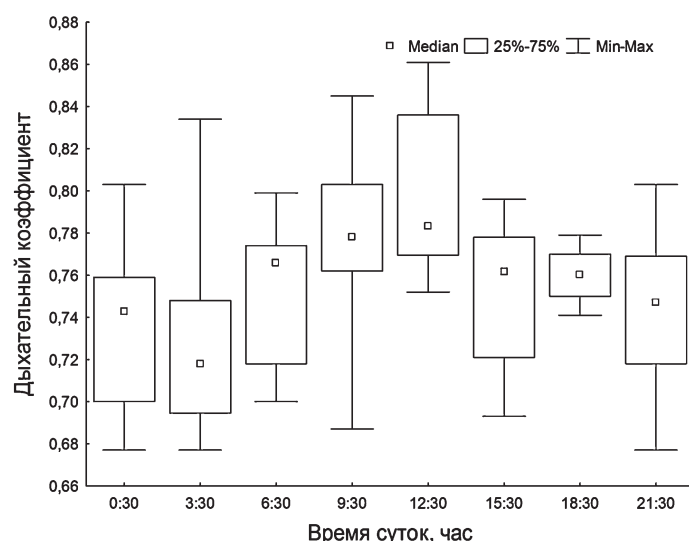


Рис. 2. Суточная динамика минимального дыхательного коэффициента синиц москвов в осенне-зимний период

кроме тех, что были получены с 8 до 11 ч ($p < 0,01$, U-критерий Манна—Уитни).

Ранее, при исследовании ритма ЭО покоя у других видов птиц, было показано 2 пика ритма ЭО в дневное время — утренние и вечерние часы и один минимум — с 2 до 4 ч ночи [6, 8, 10].

Минимальный ДК свободноживущих москвов также имеет ярко выраженный суточный ритм с минимальным значением в ночные часы (с 2 до 5 ч) и с одним пиком в дневные часы (с 11 до 14 ч) (таблица, рис. 2). Ритм ДК практически повторяет ритм ЭО с незначительным отличием в позднее дневное и сумеречное время (рис. 2). Как и ЭО покоя, ДК достоверно отличается в зависимости от времени измерения, но достоверность различий меньше ($p < 0,05$, критерий Краскела—Уоллиса: $H(7, N = 67) = 16,27$). Различия в значениях минимального ДК соответствуют различиям ЭО покоя, но достоверность различий несколько уменьшается ($p < 0,05$, U-критерий Манна—Уитни). Небольшие отличия существуют только для времени с 14 до 17 и с 17 до 20 ч.

В предыдущих исследованиях неоднократно отмечалось, что ДК у птиц ночью ниже, чем днем [18, 20, 21]; при этом минимальные значения наблюдались при ночном голодании. Днем ДК зависит от типа пищи и продолжительности периодов дневного голодания [18] и, возможно, от характера активности птиц [22].

Обсуждение

Минимальные значения ЭО покоя москвов были получены в ночные часы: с 2 до 5 ч (таблица, рис. 1). Эти значения соответствуют всем условиям базального (стандартного) метаболизма птиц (BMR) и могут сравниваться с таковыми же, полученными в других работах. $BMR = 1,76 \pm 0,17$ кДж/сут · г ($n = 8$), а максимум дневного ЭО покоя составил

$3,18 \pm 0,76$ кДж/сут · г ($n = 8$). Максимальная разница между значениями ЭО покоя днем и ночью составила 55%, что соответствует данным [4] и даже выше их. Сравнивая значения, полученные в другие часы, отметим значительно меньшие различия. Так, в дневные часы (с 14 до 17 ч) метаболизм покоя выше минимального метаболизма, измеренного ночью, всего на 18%. Значения ЭО покоя, полученные для темного времени суток в раннеутренние и вечерние часы, достоверно не различаются между собой ($p > 0,05$).

В литературе существует только одно значение базального метаболизма москвов в осенне-зимний период, полученное для птиц, содержавшихся в неволе: ночью — $2,13$ кДж/сут · г и днем — $2,52$ кДж/сут · г [6]. В нашем исследовании ночные измерения ЭО покоя ниже, а дневные — выше. По единичному сравнению нельзя заключить, связаны ли эти различия с популяционными особенностями исследованных птиц или с различиями в методах исследования.

По величине ДК можно судить об основных субстратах, используемых при окислении O_2 . Коэффициент 0,7 означает, что преобладает жировой обмен, 0,8 — белковый, 1 — углеводный [17]. Исходя из изменения ДК москвов, можно судить, что в ночные часы окисляются преимущественно жиры, а днем — либо непосредственно белки, извлекаемые из пищи, либо смесь из окисляемых субстратов. Известно, что зимой пища москвов — это чешуекрылые (в основном гусеницы шишковой листовертки) (65%) и равнокрылые (15%), остальное — семена, перепончатокрылые, жуки, клопы [23]. Эти данные хорошо соотносятся с измерениями дыхательного коэффициента москвов.

У москвов суточные ритмы ЭО покоя и минимального ДК практически совпадают. Более того, существует достоверная линейная зависимость ($p < 0,05$), связывающая увеличение ЭО покоя (E , кДж/сут · г) с увеличением ДК (рис. 3). Уравнение, описывающее

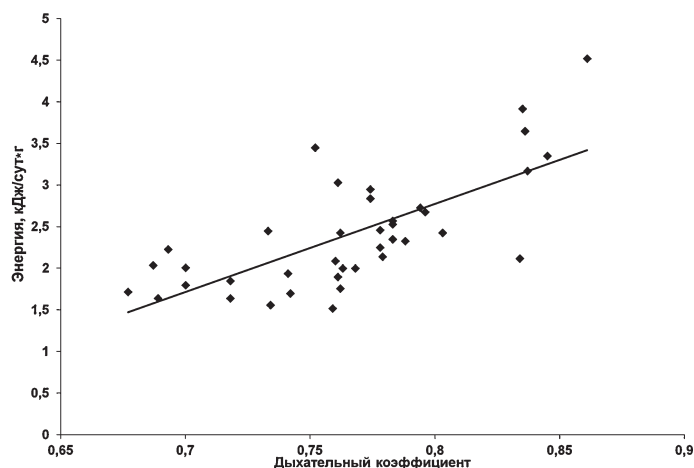


Рис. 3. Зависимость энергетического метаболизма покоя (E , кДж/сут · г) от дыхательного коэффициента (ДК) у синиц москвов в осенне-зимний период

данную зависимость, которая включает в себя и ночные и дневные данные, имеет вид

$$E = 10,57 \text{ ДК} - 5,68; n = 39, \\ R^2 = 51\% (p < 0,05).$$

Из уравнения следует, что птицы имеют низкие энергетические траты в покое при ДК, значения которых ближе к 0,7, а более высокие — ближе к 0,9. Можно предположить, что это является следствием простого совпадения двух независимых ритмов. Чтобы оценить это предположение, мы проанализировали связь между ДК и ЭО для каждого временного интервала, при этом сохранялась достоверная связь между ДК и расходом энергии. Причем для наиболее значимых периодов времени эта связь была более достоверной. Для периода с 2 до 5 ч ночи — времени минимальных значений ($p < 0,05$, $R^2 = 50\%$, $n = 8$); с 8 до 11 утра ($p < 0,05$, $R^2 = 62\%$, $n = 11$); с 11 до 14 ч — времени максимальных значений ($p < 0,05$, $R^2 = 44\%$, $n = 8$); в остальные периоды времени — ($p < 0,05$, $R^2 = 17\text{—}40\%$). Эти результаты свидетельствуют о том, что у москотов в осенне-зимний период действительно существует связь между величиной ДК и уровнем энергетических затрат. При этом наиболее низкие энергетические затраты и, можно предположить, более спокойное состояние соответствуют процессу окисления жиров, а более высокие энергетические затраты, более активное состояние требуют окисления белков и углеводов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McKechnie A.E., Wolf B.O.* The allometry of avian basal metabolic rate: good predictions need good data // *Physiol. Biochem. Zool.* 2004. Vol. 77. N 3. P. 502—521.
2. *Konarzewski M., Książek A.* Determinants of intra-specific variation in basal metabolic rate // *J. Comp. Physiol. B.* 2012. Vol. 183. P. 27—41.
3. *McKechnie A.E.* Phenotypic flexibility in basal metabolic rate and the changing view of avian physiological diversity: a review // *J. Comp. Physiol. B.* 2008. Vol. 178. N 3. P. 235—247.
4. *Aschoff J., Pohl H.* Rhythmic variation in energy metabolism // *Federation Proc.* 1970. Vol. 29. N 4. P. 1541—1552.
5. *Kendeigh S.C., Dolnik V.R., Gavrilo V.M.* Avian energetic // *Granivorous birds in ecosystem* / Eds J. Pinowski, S.C. Kendeigh. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1977. P. 78—107.
6. *Гаврилов В.М.* Суточные измерения метаболизма покоя у птиц // *Орнитология.* 1981. Т. 16. № 15. С. 42—50.
7. *Pohl H.* Circadian rhythms of metabolism in cardueline finches as function of light intensity and season // *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.* 1977. Vol. 56. N 2. P. 145—153.
8. *Gavrilo V.M.* Seasonal and circadian changes of thermoregulation in passerine and non-passerine birds: which is more important? // *Acta XVIII Congressus Internationalis Ornithologici* / Eds V.D. Ilyichov, V.M. Gavrilo V.M. M.: Nauka, 1985. P. 1254—1277.
9. *Saarela S., Klapper B., Heldmaier G.* Daily rhythm of oxygen consumption and thermoregulatory responses in some

Заключение

Таким образом, ЭО в покое и ДК у москотов имеют суточные ритмы с минимальным значением в ночные часы (с 2 до 5 ч) и с одним пиком в дневные часы (с 11 до 14 ч), при этом оба ритма совпадают. Существует достоверная линейная зависимость, связывающая увеличение ЭО покоя с увеличением ДК. Максимальная разница между значениями ЭО покоя днем и ночью составила 55%. ЭО москотов, обитающих в Подмоскowie, соответствует уровню ЭО воробьиных птиц, однако влияние различных экологических и физиологических факторов на их уровень ЭО требует дальнейшего изучения. Принимая во внимание ритм ДК, можно сделать вывод, что в ночные часы преимущественно окисляются жиры, накопленные во время питания, а днем — непосредственно белки, извлекаемые из пищи.

Мы благодарим С.Ю. Клейменова за помощь во время работы, В.М. Гаврилова за обсуждение результатов и анонимного рецензента за подробный разбор рукописи.

* * *

Исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 12-04-01288-а).

European winter- or summer-acclimatized finches at different ambient temperatures // *J. Comp. Physiol. B.* 1995. Vol. 165. N 5. P. 366—376.

10. *Гаврилов В.М., Керимов А.Б., Голубева Т.Б., Иванкина Е.В., Ильина Т.А., Карелин Д.В., Коляскин В.В.* Энергетика, морфофизиологическая разнокачественность особей и структура популяций у птиц. I. Энергетика, морфофизиологическая разнокачественность и структура популяции у больших синиц Подмоскowie // *Орнитология.* 1996. Т. 27. С. 34—73.

11. *Woodin M., Stephenson R.* Circadian rhythms in diving behavior and ventilatory response to asphyxia in canvasback ducks // *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 1998. Vol. 274. P. R686—R693.

12. *Arens J.R., Cooper S.J.* Seasonal and diurnal variation in metabolism and ventilation in House Sparrows // *Condor.* 2005. Vol. 107. N 2. P. 433—444.

13. *Swanson D.L., Liknes E.T.* A comparative analysis of thermogenic capacity and cold tolerance in small birds // *J. Exp. Biol.* 2006. Vol. 209. P. 466—474.

14. *White C.R., Blackburn T.M., Martin G.R., Butler P.J.* Basal metabolic rate of birds is associated with habitat temperature and precipitation, not primary productivity // *Proc. R. Soc. B.* 2007. Vol. 274. N 1607. P. 287—293.

15. *McNab B.K.* Ecological factors affect the level and scaling of avian BMR // *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.* 2009. Vol. 152. N 1. P. 22—45.

16. Swanson D.L. Seasonal metabolic variation in birds: functional and mechanistic correlates // Curr. Ornithol. 2010. Vol. 17. P. 75–129.
17. Шмидт-Нильсен К. Физиология животных. При-
способление и среда. Кн. 1 / Пер. с англ. М.: Мир, 1982. 416 с.
18. Walsberg G.E, Wolf B.O. Variation in the respiratory quotient of birds and implications for indirect calorimetry using measurements of carbon dioxide production // J. Exp. Biol. 1995. Vol. 198. P. 213–219.
19. Lighton J.R.B. Measuring metabolic rates. A manual for scientists. Oxford: Oxford Univ. Press, 2008. 201 p.
20. Powers D.R. Diurnal variation in mass, metabolic rate, and respiratory quotient in Anna's and Costa's hummingbirds // Physiol. Zool. 1991. Vol. 64. N 3. P. 850–870.
21. Prinzinger R., Schäfer T., Schuchmann K.-L. Energy metabolism, respiratory quotient and breathing parameters in two convergent small bird species: The fork-tailed sunbird *Aethopyga christinae* (Nectariniidae) and the chilean hummingbird *Sephanoides sephanoides* (Trochilidae) // J. Therm. Biol. 1992. Vol. 17. N 2. P. 71–79.
22. Suarez R.K., B. Lighton J.R., Moyes C.D., Brown G.S., Gass C.L., Hochachka P.W. Fuel selection in rufous hummingbirds: Ecological implications of metabolic biochemistry // Proc. Natl. Acad. Sci. 1990. Vol. 87. N 23. P. 9207–9210.
23. Птушенко Е.С., Иноземцев А.А. Биология и хозяйственное значение птиц Московской области и сопредельных территорий. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1968. 462 с.

Поступила в редакцию
11.03.13

DIURNAL RHYTHMS OF STANDARD METABOLIC RATE AND RESPIRATORY QUOTIENT IN COAL TIT (*PERIPARUS ATER*) IN AUTUMN-WINTER PERIOD

V.V. Gavrilov, G.V. Morgunova

The research was carried out in October–March 2009–2013 at Zvenigorod Biological Station (the Moscow Region, Russia, 55°44' N, 36°51' E). Birds were captured by mist-nets. Standard metabolic rate and respiratory quotient were measured by flow-through respirometry in 64 experiments on Coal Tits. Standard metabolic rate and respiratory quotient had well pronounced diurnal rhythms with minimum in the nighttime (from 2 a.m. to 5 a.m.) and maximum in the daytime (from 11 a.m. to 2 p.m.). A significant relationship between the standard metabolic rate and the respiratory quotient was found. The maximum difference between standard metabolic rates during daytime and nighttime was 55%. During the night, mainly fat reserves were oxidized, whereas proteins were oxidized during the daytime.

Key words: Coal tit, diurnal rhythm, standard metabolic rate, RMR, RQ, respiratory quotient.

Сведения об авторах

Гаврилов Вадим Валерьевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ЗБС МГУ. Тел.: 8-495-992-42-14; e-mail: vadingavrilov@yandex.ru.

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

**Указатель статей, опубликованных
в журнале “Вестник Московского университета.”
Серия 16. “Биология” в 2014 году**

	№	Стр.
<i>Кирпичников М.П., Хохлов А.Н.</i> “Moscow University Biological Sciences Bulletin” — новая эра эволюции (2007—2013)	3	3
Биофизика		
<i>Казакова Т.А., Новиков С.М., Левин Г.Г., Максимов Г.В.</i> Исследование состояния цитоплазмы нейрона методом динамической фазовой микроскопии	4	25
<i>Максимов Г.В., Тютяев Е.В., Колмыкова Т.С., Ревин В.В.</i> Исследование распределения и интенсивности флуоресценции листа пшеницы при воздействии температуры	1	9
Биохимия		
<i>Кузьмичева Л.В., Лопатникова Е.А., Максимов Г.В.</i> Изменения биохимических показателей крови при свинцовой интоксикации и коррекции пектином	2	10
Геронтология		
<i>Лапина Н.Е., Негашева М.А., Окушко Р.В.</i> Влияние некоторых биосоциальных факторов на темпы старения и продолжительность жизни женщин (на примере изучения долгожителей г. Тирасполь)	4	20
<i>Хохлов А.Н.</i> О бессмертной гидре. Опять	4	15
<i>Хохлов А.Н., Клебанов А.А., Кармушаков А.Ф., Шиловский Г.А., Насонов М.М., Моргунова Г.В.</i> Тестирование геропротекторов в экспериментах на клеточных культурах: выбор оптимальной модельной системы	1	13
Микробиология		
<i>Барский Е.Л., Дольникова Г.А., Саванина Я.В., Лобакова Е.С.</i> Генерация разности электрических потенциалов на электродах микробного топливного элемента при анаэробном окислении субстратов ассоциациями микроорганизмов	3	24
<i>Закалюкина Ю.В., Голиченков М.В., Бровкина О.И., Пуяткина Т.С.</i> Сравнительное изучение структуры актиномицетных комплексов, связанных с муравьями <i>Lasius niger</i> и <i>Formica cunicularia</i> и их гнездами	3	30
Микология и альгология		
<i>Благовещенская Е.Ю.</i> Фитопатогенные микромицеты Звенигородской биологической станции имени С.Н. Скадовского	2	42
<i>Бубнова Е.Н., Грум-Гржимайло О.А., Коновалова О.П., Марфенина О.Е.</i> 50 лет микологических исследований на Беломорской биостанции им. Н.А. Перцова: основные направления, итоги, перспективы	1	29
<i>Толпышева Т.Ю.</i> Микотоксины, усниновая кислота и их распределение в лишайниках родов <i>Cetraria</i> , <i>Flavocetraria</i> , <i>Cladonia</i>	3	37
Фауна, флора		
<i>Гаврилов В.В., Моргунова Г.В.</i> Суточные ритмы энергетического метаболизма покоя и дыхательного коэффициента у москочек (<i>Periparus ater</i> , Aves) в осенне-зимний период	4	46
<i>Демидова А.Н., Прилепский Н.Г.</i> Комплексный подход к анализу флоры	2	46
<i>Любезнова Н.В.</i> Динамика развития ювенильных растений на гераниево-копеечниковых лугах альпийского пояса северо-западного Кавказа	1	47
<i>Михайлов К.Г.</i> Материалы по фауне пауков (Arachnida, Aranei) Беломорской биологической станции МГУ	3	49
<i>Муравьев И.В., Артемьева Е.А., Бёме И.Р.</i> Географическое распространение, биотопы гнездования и численность желтоголовой трясогузки <i>Motacilla citreola</i> Pallas, 1776 (Passeriformes, Motacillidae, Motacillinae) в Среднем Поволжье	3	42

Физиология

Кузенков В.С., Крушинский А.Л. Протекторное влияние нитрата магния на ишемию мозга . . .	4	9
Молчанов А.Ю., Ивановская М.Г., Бурлакова О.В., Супруненко Е.С., Молчанова Е.С. Мелатонин и деторождение. Часть 2. Постимплантационный период	1	3
Плотникова Ю.М., Камзолкина О.В., Аусубел Ф.М. Новая модельная система для изучения иммунитета животных к грибным инфекциям	2	3
Сангаджиева А.Д., Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Мезенцева М.В., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние глипролинов PGP и N-acetyl-PGP на экспрессию генов цитокинов при стрессорном и ацетатном язвообразовании	4	3
Чернышева М.Б., Супруненко Е.А., Голиченков В.А. Возрастные изменения печени мыши при индуцированном и физиологическом фиброзе	3	7
Чеснокова Е.А., Сарычева Н.Ю., Дубынин В.А., Каменский А.А., Калихевич В.Н., Ардемасова З.А. Влияние сойморфин-5-амида на поведение белых крыс	3	13

Цитология

Виноградская И.С., Кузнецова Т.Г., Супруненко Е.А. Митохондриальная сеть скелетных мышечных волокон	2	16
---	---	----

Экология

Дмитриева Е.В. Экспериментальное исследование влияния температуры на смертность и темпы развития в раннем онтогенезе серой жабы <i>Bufo bufo</i>	2	31
Лобакова Е.С., Васильева С.Г., Дольникова Г.А., Кашеева П.Б., Дедов А.Г. Изучение иммобилизации ассоциации бактерий-нефтедеструкторов на полимерных материалах различной химической природы.	4	36
Остроумов С.А., Поклонов В.А., Котелевцев С.В., Орлов С.Н. Токсичность наночастиц золота для растений и экспериментальной водной системе	3	19
Поромов А.А., Смуров А.В. Характеристика заселенности морских звезд <i>Asterias rubens</i> L. копеподами <i>Scottomyzon gibberum</i> Scott в условиях различной антропогенной нагрузки . . .	2	35
Разумовский Л.В., Гололобова М.А. Долговременные трансформации диатомовых комплексов в озерах Боровое и Глубокое	1	19
Тушмалова Н.А., Лебедева Н.Е., Иголкина Ю.В., Саранульцева Е.И. Инфузория спиростома как индикатор загрязнения водной среды.	2	27
Юзбеков А.К., Замолодчиков Д.Г., Иващенко А.И. Фотосинтез у ели европейской в лесных экосистемах экспериментального полигона "Лог Таежный".	4	32

Энтомология

Беляев О.А., Чуканов В.С., Фарисенков С.Э. Сравнительная характеристика крылового аппарата и полета двукрылых семейства Syrphidae (Diptera: Syrphidae)	1	24
Бенедиктов А.А. Виброакустические сигналы кузнечиков подсемейства Conocephalinae (Orthoptera, Tettigoniidae) европейской части России	4	43

ТРЕБОВАНИЯ ДЛЯ ПРЕДСТАВЛЯЕМЫХ СТАТЕЙ

Статьи, направляемые в журнал “Вестник Московского университета. Серия 16. Биология” должны удовлетворять следующим требованиям.

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение, объекты (материалы) и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединять с предыдущим пунктом как “результаты и их обсуждение”), выводы, список литературы. Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но даже в этом случае они должны содержать резюме и ключевые слова. Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc). Объем рукописи, если в ней нет таблиц и рисунков, не должен превышать 3200 слов (шрифт Times New Roman, 12 кегль, междустрочный интервал — двойной), включая список литературы. На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы, инициалы и фамилии авторов, наименование подразделения биологического факультета МГУ (кафедра, лаборатория), e-mail автора, ответственного за переписку с редакцией. Место работы соавторов, не являющихся сотрудниками биологического факультета, отмечается в сноске на первой странице. Далее следуют резюме статьи на русском языке (75—250 слов) и ключевые слова. После текста статьи на отдельной странице печатается резюме на английском языке с заглавием и ключевыми словами (полный перевод русской версии). На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью, научная степень, должность, место работы, телефон (с кодом), e-mail.

Число таблиц и рисунков должно быть минимальным (2—3 таблицы или 2—3 рисунка с соответствующим уменьшением объема текста). Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, делаются не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи. Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи, с расшифровками всех используемых сокращений, а рисунки и таблицы — иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово “рисунок” (“таблица”) при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется. Графические иллюстрации и фотографии представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов. Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Иллюстрации выполняются в черно-белом цвете. Таблицы печатаются на отдельных страницах в конце рукописи. Каждая графа таблицы должна иметь заголовок.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием его порядкового номера. При ссылке на несколько источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], если номера идут подряд, то через тире [3—7]. Указатель литературы к статьям (в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту) включает от 10 до 50 ссылок, оформленных следующим образом:

- 1) **Книга:** Автор (инициалы после фамилии). Название. Город: Издательство (без кавычек), Год. Общее количество страниц (336 с.).
- 2) **Статья в сборнике:** Автор (инициалы после фамилии). Название статьи // Название сборника / Под ред. (Ed.) Инициалы и фамилия. Город: Издательство (без кавычек), Год. Страницы. С. 5—7.
- 3) **Статья в журнале:** Автор (инициалы после фамилии). Название статьи // Журнал (принятое сокращенное название — Бюл. МОИП; Biochem.). Год. Том (Т. (рус.) или Vol. (англ.)). Номер (выпуск). Страницы. С. 25—36. (рус.) или P. 393—408. (англ.).
- 4) **Автореферат диссертации:** Автор (инициалы после фамилии). Название: Автореф. дис. ... канд. (докт.) биол. Город, Год. Общее количество страниц. 23 с.
- 5) **Электронный ресурс:** Название сайта — год [Электронный ресурс]. Дата обновления (если есть) (дата обращения).

Дата обращения — это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана.

Официальный сайт ЮНЕСКО 2009. (URL: <http://www.unesco.org> 15.05.2013).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

После списка литературы идет строка “Поступила в редакцию...” с указанием даты сдачи рукописи.

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ).

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвидовые названия.

Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

Не принимаются к печати работы, которые уже опубликованы или отправлены на печать в другие издания.

Плата с авторов за публикацию не взимается.

Вся переписка с редакцией ведется по адресу vestnik@mail.bio.msu.ru. Тел. 8-495-939-28-33.

УЧРЕДИТЕЛИ:

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
биологический факультет МГУ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Михаил Петрович КИРПИЧНИКОВ — акад. РАН, докт. биол. наук, проф., декан биологического факультета МГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

ГОЛИЧЕНКОВ Владимир Александрович — докт. биол. наук, проф., зав. каф. эмбриологии (зам. главного редактора)
ХОХЛОВ Александр Николаевич — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии (зам. главного редактора)
САВАНИНА Янина Вячеславовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. каф. биоинженерии (ответственный секретарь)
АТАБЕКОВ Иосиф Григорьевич — акад. РАН, докт. биол. наук, проф., зав. каф. вирусологии
ВАСИЛЬЕВ Борис Дмитриевич — докт. биол. наук, проф. каф. зоологии позвоночных
ГУСЕВ Николай Борисович — чл.-корр. РАН, докт. биол. наук, проф., зав. каф. биохимии
ДБЯКОВ Юрий Таричанович — докт. биол. наук, проф., зав. каф. микологии и альгологии
ЖАНТИЕВ Рустем Девлетович — докт. биол. наук, проф., зав. каф. энтомологии
НЕДОСПАСОВ Сергей Артурович — чл.-корр. РАН, докт. биол. наук, проф., зав. каф. иммунологии
ОСТРОВСКИЙ Михаил Аркадьевич — акад. РАН, докт. биол. наук, проф., зав. каф. молекулярной физиологии
ПАВЛОВ Дмитрий Сергеевич — акад. РАН, докт. биол. наук, проф., зав. каф. ихтиологии
РАЗИН Сергей Владимирович — чл.-корр. РАН, докт. биол. наук, проф., зав. каф. молекулярной биологии
РУБИН Андрей Борисович — чл.-корр. РАН, докт. биол. наук, проф., зав. каф. биофизики
СКУЛАЧЁВ Владимир Петрович — акад. РАН, докт. биол. наук, проф., директор Института физико-химической биологии МГУ
ТИМОНИН Александр Константинович — докт. биол. наук, зав. каф. ботаники
ШЕСТАКОВ Сергей Васильевич — акад. РАН, докт. биол. наук, проф. каф. генетики
ШУЛЬГОВСКИЙ Валерий Викторович — докт. биол. наук, проф., зав. каф. высшей нервной деятельности

Редактор М.Ю. БУЯНОВА
Технический редактор Н.И. Матюшина
Корректоры А.Я. Марьясис, В.Н. Конкина

Журнал зарегистрирован в Министерстве печати и информации РФ.
Свидетельство о регистрации № 1561 от 14 февраля 1991 г.

Адрес редакции:

119992, Россия, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,
биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова.
Тел. (495) 939-29-33; e-mail: vestnik@mail.bio.msu.ru, gene_b@mail.ru
веб-сайт: <http://git.bio.msu.ru/vestnik.html>

Подписано в печать 10.11.2014. Формат 60×90 1/8.
Бумага офс. № 1. Гарнитура Таймс. Офсетная печать.
Усл. печ. л. 6,5. Уч.-изд. л. 6,14. Тираж экз. Изд. № 10103. Заказ №

Издательство Московского университета.
125009, Москва, ул. Б. Никитская, 5. Тел. (495) 697-31-28
Типография МГУ.
119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 15

ISSN 0201—7385
ISSN 0137—0952

**ИНДЕКС 71016 (каталог “Роспечать”)
ИНДЕКС 39360 (каталог “Пресса России”)**

**ИЗДАТЕЛЬСТВО
МОСКОВСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА**
